
Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana

Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana

Library of Congress Cataloging-in-Publication Data

Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana / autores, Stephen J. Cavalieri ... [et al.] ; editora coordinadora, Marie B. Coyle.

p. ; cm.

Includes index.

ISBN 1-55581-347-X (soft cover)

1. Drug resistance in microorganisms—Handbooks, manuals, etc.

[DNLM: 1. Microbial Sensitivity Tests—methods—Laboratory Manuals. 2. Anti-Bacterial Agents—pharmacology—Laboratory Manuals. 3. Clinical Laboratory Techniques—Laboratory Manuals. 4. Drug Resistance, Bacterial—Laboratory Manuals. QW 25.5.M6 M2936 2005] I. Cavalieri, Stephen J. II. American Society for Microbiology.

QR177.M37 2005

616.9'041—dc22

2005014187

Índice de Materias

<i>Autores</i>	vii
<i>Contribuyentes</i>	vii
<i>Prefacio</i>	xi
<i>Agradecimientos</i>	xiii

I MODOS Y MECANISMOS

1 Modos de Acción de los Antimicrobianos <i>Yvette S. McCarter</i>	3
2 Beta-lactamasas <i>Susan E. Sharp</i>	15

II METODOS DE PRUEBA

3 Guía Para Usar los Documentos NCCLS <i>José H. Ortez</i>	25
4 Prueba de Difusión por Disco <i>José H. Ortez</i>	39
5 Pruebas De CIM <i>Ivonne D. Rankin</i>	53
6 Aseguramiento de Calidad/Control de Calidad (AC/CC) <i>Ivonne D. Rankin</i>	65
7 Sistemas Comerciales <i>Ivonne D. Rankin</i>	93

III ORGANISMOS GRAM POSITIVOS

8 <i>Estafilococos</i> <i>Stephen J. Cavalieri</i>	103
9 <i>Enterococcus</i> spp. <i>Robert L. Sautter</i>	119

10 *Streptococcus pneumoniae* 135
Stephen J. Cavalieri

11 *Streptococcus* spp. 145
Robert L. Sautter

IV ORGANISMOS GRAM NEGATIVOS

12 *Enterobacteriaceae* 155
Ronald J. Harbeck

13 No *Enterobacteriaceae* 171
Carol A. Spiegel

14 *Haemophilus* spp. 183
Ronald J. Harbeck & Carol A. Spiegel

15 *Neisseria/Moraxella* 191
Ronald J. Harbeck

16 *Anaerobios* 201
Carol A. Spiegel

RESPUESTAS

Guía para la Resolución de Problemas 211

APÉNDICE

Reglas Básicas de Bio-seguridad 225

Receta para 0,5 McFarland Oficial 226

*Sugerencias para Verificación de Resultados Extraños—
de NCCLS M100-S14* 227

*Prueba de Susceptibilidad por Difusión por discos—una Guía para
la Resolución de Problemas* 229
José H. Ortez

Glosario 231

Editora Coordinadora

Marie B. Coyle
Departments of Laboratory Medicine and Microbiology
University of Washington
Seattle, Washington 98195

Autores

Stephen J. Cavalieri
Department of Pathology
Creighton University Medical Center
Omaha, Nebraska 68131

Ronald J. Harbeck
Clinical Reference Laboratories and
Department of Medicine
National Jewish Medical and
Research Center
Denver, Colorado 80206

Yvette S. McCarter
Department of Pathology
University of Florida
Jacksonville, Florida 32209

José H. Ortez
Bacteriology Department,
Microbiology Services
Kaiser Permanente Regional
Reference Laboratories
North Hollywood, California 91605

Ivonne D. Rankin
Clinical Microbiology Department
Mount Sinai Medical Center
New York, New York 10029

Robert L. Sautter
Departments of Microbiology and
Point of Care
Pinnacle Health System
Harrisburg, Pennsylvania 17101

Susan E. Sharp
Department of Pathology
Kaiser Permanente – NW
Portland, Oregon 97230

Carol A. Spiegel
Department of Pathology and
Laboratory Medicine
University of Wisconsin and
University of Wisconsin Hospital &
Clinics
Madison, Wisconsin 53792

Agradecimientos

Luis **Actis**
Department of Microbiology
Miami University
Oxford, Ohio 45056

María Isabel **Arias Bustamante**
Bacteriology
National Institute of Health
Lima, Peru

Lúcia Helena **Berto**
CGLAB/FUNASA
Secretariat of Health
Brasilia – DF, Brazil

Jorge **Matheu Álvarez**
Bacteriology Department
National Laboratory of Health
Ministry of Health
Barcenas Villa Nueva, Guatemala

Carlos **Mejía**
Infectious Diseases Division
Roosevelt Hospital
Guatemala City, Guatemala

Lai King **Ng**
National Laboratory for Enteric
Pathogens
Health Canada
Winnipeg, Manitoba, Canada

Teresa Camou
Department of Public
Health Laboratories
Bacteriology Unit
Ministry of Public Health
Montevideo—Uruguay

Elena Campos Chacón
National Reference Center of EDAS/
Cholera
Costa Rican Institute of Nutrition and
Health Investigation and Education
Cartago – Costa Rica

Alejandra Corso
National Institute of Infectious Diseases
Doctor Carlos G. Malbrán Institute
Buenos Aires, Argentina

José Ramiro Cruz
Pan American Health Organization
Washington, D.C. 20037

Cândida de Dantas Souza
CGLAB/FUNASA
Secretariat of Health
Brasília – DF, Brazil

Silvia Figueiredo Costa
Division of Control and Prevention
of Infectious Diseases
PAHO-WHO.
Brasília, Brazil

Jean-Marc Gabastou
Unit of Essential Drugs, Vaccines and
Technology
Pan American Health Organization
Washington, D.C. 20037

Marcelo Galas
National Institute of Infectious Diseases
Doctor Carlos G. Malbrán Institute
Buenos Aires, Argentina

Remei Gordillo
Microbiology Section
Roosevelt Hospital
Guatemala City, Guatemala

María Soledad Prat Miranda
General Bacteriology Section
Institute of Public Health
Santiago, Chile

Esteban Riera Fanego
Public Health Center Laboratory
Secretariat of Health and Social Welfare
Asunción, Paraguay

Rosa Sacsquispe Contreras
Bacteriology Division
Special Bacteriology Laboratory
National Institute of Health
Lima, Perú

Roxane Salvatierra González
Unit of Transmissible Diseases
Panamerican Health Organization/World
Health Organization
Washington, DC. USA

Damarys Sánchez
Bacteriology Department
Management of Diagnosis and
Epidemiology
“Rafael Rangel” National Institute of
Hygiene
Caracas, Venezuela

Gabriel Schmunis
Control of Transmissible Diseases Unit
Panamerican Health Organization/
World Health Organization
Washington, DC. USA

Lily Schuermann
American Society for Microbiology
Washington, D.C. 20036

Kimberly Smith
Centers for Disease Control
and Prevention
Atlanta, Georgia 30333

Daniel Sordelli
Department of Microbiology
University Buenos Aires School
of Medicine
Buenos Aires, Argentina 1121

Janet Fick **Hindler**
Centers for Disease Control and
Prevention
Atlanta, Georgia 30333
University of California
Los Angeles, California 90095

Blanca **Huapaya Cabrera**
Bacteriology
National Institute of Health
Lima, Peru

Sandra E. **Jiménez de Fuentes**
Doctor Max Bloch Bacteriology Central
Laboratory
Ministry of Health
San Salvador, El Salvador

Steve **Lerner**
Infectious Diseases Division
Wayne State University School
of Medicine
Detroit, Michigan 48201

Daniel **Lissit**
American Society for Microbiology
Washington, D.C. 20036

Alina **Llop Hernández**
National Laboratory of Reference Micro-
biology
Pedro Kouri, Tropical Medicine Institute
Secretariat of Health
La Habana, Cuba

Sergio R. **López Cruz**
Bacteriology Department
National Reference Center of Diagnosis
Ministry of Health
Managua, Nicaragua

Octavio V. **Martínez**
Department of Orthopedics
University of Miami School of Medicine
Miami, Florida 33101

Aníbal **Sosa**
International Program
Alliance for Prudent Use of Antibiotics
Boston, MA, USA

Fred C. **Tenover**
Centers for Disease Control
and Prevention
Atlanta, Georgia 30333

Gilda **Tolari**
Clinical Microbiology Department
Doctor Defilló National Public Health Labo-
ratory
Secretariat of Health and Social Welfare
Santo Domingo, Dominican Republic

Christian **Trigoso**
National Health Laboratories Institute Minis-
try of Health and Social Welfare INLASA
La Paz, Bolivia

Ezequiel **Tuduri Franco**
National Institute of Infectious Diseases
Doctor Carlos G. Malbrán Institute
Buenos Aires, Argentina

María Luz **Zamudio Rojas**
Bacteriology
National Institute of Health
Lima, Peru.

Jeannette **Zurita**
Microbiology Laboratory
Vozandes Hospital
Quito – Ecuador

Prefacio

El propósito de este documento es el de asistir a los laboratoristas de instituciones clínicas y centros de salud pública a entender los principios y la práctica de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. El documento sigue de cerca el contenido y diseño del excelente CD-ROM lanzado en el 2002 por los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Atlanta, Georgia, U.S.A. Este CD-ROM se titula “*Antimicrobial Susceptibility Testing—A Self-study Program*” (*Probando de Susceptibilidad Antimicrobiana-Un Programa de Estudio Individual*) y sus autores son F.C. Tenover, J.F. Hindler y E. Rosner.

Además de proveer reportes de susceptibilidad correctos para guiar el tratamiento del paciente, otro objetivo importante de este manual es el de lograr que los laboratorios radicados en distintos hospitales, regiones y países sigan con exactitud los mismos procedimientos de pruebas y de control de calidad. De este modo, los patrones de susceptibilidad que emergen a través de las Américas pueden ser comparados con confianza. Por medio de estos resultados, los especialistas en enfermedades infecciosas, epidemiólogos y otros funcionarios responsables por la salud pública pueden reconocer el desarrollo de nuevos patrones de resistencia a agentes antimicrobianos. Esto a su vez, le permitirá a los practicantes clínicos a proveer el tratamiento óptimo e implementar otras medidas para limitar la difusión de organismos resistentes a través de los hospitales y la comunidad.

En este manual los mecanismos principales de resistencia son descritos. La información básica de cada capítulo está diseñada para ayudar al lector a comprender no solo los principios sino también los errores que pueden ocurrir en los procesos de pruebas de susceptibilidad. El documento hace énfasis en el método de difusión por disco el cual ha sido certificado como exacto, reproducible, técnicamente simple y relativamente económico. También se nota la importancia del control de la calidad para que tanto los laboratorios como los médicos tengan confianza en la certeza de los resultados.

Los científicos continúan desarrollando agentes antimicrobianos cada vez más potentes para combatir las enfermedades infecciosas. Sin embargo, la combinación de nuevas drogas y nuevos mecanismos de resistencia a éstos ha complicado el proceso de ensayo necesario para establecer la presencia de esta resistencia. A veces, estos métodos necesitan ser modificados para asegurar que el laboratorio pueda descubrir organismos con nuevos patrones de resistencia.

Este documento ha sido diseñado para técnicos y supervisores de laboratorios de microbiología en los sectores públicos o privados quienes efectúan o interpretan los resultados de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Los lectores con experiencia en el área de la microbiología clínica encontrarán que la información contenida en este manual es directamente aplicable a su trabajo. Los directores encontrarán esta información útil para la planificación y diseño de nuevos procedimientos y prácticas de las pruebas de susceptibilidad. Este manual también pudiera servir como recurso de referencia para estudiantes de tecnología médica u otros en programas de enseñanza en el campo de la microbiología clínica.

Para obtener el mejor beneficio de este manual es importante que el lector tenga acceso a las más recientes publicaciones de la NCCLS (U.S.A) las cuales están descritas en el Capitulo 3 de este manual.

Debido a la posibilidad de generar aerosoles con potencial infeccioso durante las operaciones necesarias para efectuar las pruebas, el manual incluye en el Apéndice algunas de las precauciones elementales para la protección del personal de laboratorio.

Marie B. Coyle
Redactor

Agradecimientos

Este manual no podría haber sido posible sin la cooperación de Fred Tenover, quien nos permitió adaptar un magnífico curso desarrollado para el CDC por Janet Fick Hindler y Eunice Rosner. Los autores Stephen J. Cavalieri, Ronald J. Harbeck, Yvette S. McCarter, José H. Ortez, Ivonne D. Rankin, Robert L. Sautter, Susan E. Sharp y Carol A. Spiegel generaron una versión en idioma español adecuada para las necesidades de distintos países de América. Queremos así mismo agradecer a Janet Fick Hindler por su generosidad en proveernos figuras y sus valiosos consejos. Kimberly Smith del CDC y Steve Moseley de University of Washington también nos suministraron figuras para esta obra. Ivonne Rankin consistentemente respondió a nuestros urgentes pedidos de traducción de textos en español. Las capacidades técnicas y lingüísticas de Jorge Garza constituyeron un aporte esencial para completar este manual. Jean-Marc Gabastou sirvió como un hábil y eficiente intermediario para todas las comunicaciones entre voluntarios de PAHO y ASM.

El equipo de autores fue convocado y deslumbrantemente liderado y coordinado por Marie B. Coyle, quien fue designada por el ASM International Microbiology Education Committee (IMEC). Los materiales preliminares fueron remitidos a un número de colegas expertos en la materia, quienes contribuyeron a mejorarlos con sus comentarios y críticas constructivas. Se agradece especialmente a Luis Actis, Octavio Martínez, Stephen Lerner (anterior director del ASM International Committee), José Ramiro Cruz (PAHO, Regional Advisor for Laboratory and Blood Services) y Lily Schuermann (ASM, Director of International Affairs) por su asistencia en diferentes etapas de la preparación de este manual. También estamos profundamente agradecidos a Dan Lissit de la ASM, quien hábil y pacientemente guió el desarrollo de este manual desde su inicio. En nombre del ASM IMEC deseo expresar mi gratitud a todos los autores y a los que han contribuido a generar esta fina obra. Por último, agradecemos el apoyo de la Pan American Health Organization y de la American Society for Microbiology, organizaciones que generosamente dieron el apoyo económico para la realización de esta obra.

Daniel Sordelli
Chair, International Microbiology Education Committee

I

Modos y Mecanismos

1

Modos de Acción de los Antimicrobianos

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Comparar y distinguir la estructura básica de las bacterias gram-positivas y gram-negativas.
 - Explicar como cada grupo de agentes antimicrobianos afecta estructuras clave o rutas metabólicas en las bacterias.
 - Enumerar los mecanismos de resistencia en las bacterias.
 - Describir como las bacterias adquieren resistencia a los agentes antimicrobianos.
-

ANTECEDENTES

Cada tipo de agente antimicrobiano tiene un modo de acción único. Para entender como actúan los agentes antimicrobianos es necesario explicar algunas características básicas de la estructura celular bacteriana y como funcionan los blancos de los antimicrobianos en la célula bacteriana.

A pesar que las estructuras de las bacterias gram-positivas y gram-negativas son similares, existen algunas diferencias claves. Estas diferencias son las bases de la capacidad que tiene un agente antimicrobiano para inhibir el crecimiento ya sea de bacterias gram-positivas o gram-negativas. Sin embargo, algunos agentes actúan en ambos tipos de bacteria y estos a menudo se conocen como agentes de amplio espectro.

ESTRUCTURA DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Como se observa en la Figura 1.1 la estructura más externa de la célula gram-negativa tiene muchos componentes:

Pared Celular

- **La membrana externa** sirve como la principal barrera de permeabilidad de la célula y ayuda a retener proteínas en el espacio periplásmico. (Algunos autores no consideran a esta membrana como parte de la pared celular.)
 - **Porinas** son canales llenos de agua en la membrana externa que facilitan el transporte de nutrientes y sustancias de bajo peso molecular dentro de la célula,
-

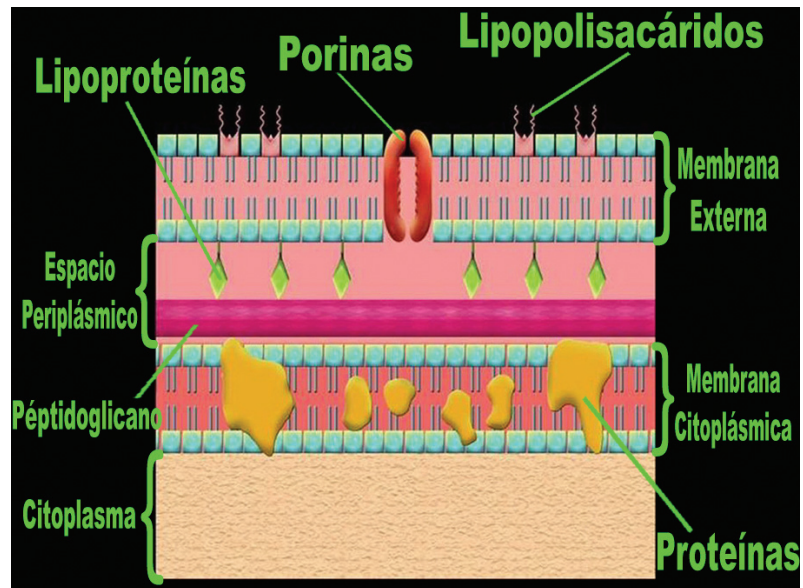


Figura 1.1—Estructura de la pared en una bacteria gram-negativa

incluyendo agentes antimicrobianos. Las bacterias varían en el número y tipo de porinas que contienen.

- **Lipopolisacáridos** se encuentran en la superficie de la célula y son el componente esencial de las endotoxinas. Ellos contribuyen a la capacidad de la bacteria para causar enfermedad y dan a las bacterias gram-negativas su carga negativa neta.
- **Lipoproteínas** adhieren la membrana externa a la capa de mureína.
- La capa de **péptidoglicano** de las bacterias gram-negativas es un polímero relativamente delgado que consiste de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamida entrelazados. Esta se conoce con frecuencia como la capa de mureína o pared celular y es responsable de mantener la forma del organismo. Está localizado dentro de el espacio periplásmico.
- El **espacio periplásmico** se encuentra entre la membrana externa y la membrana citoplasmática. Las proteínas periplásmicas incluyen proteínas de enlace para sustratos específicos, enzimas hidrolíticas y enzimas detoxificantes.

Membrana Citoplásmica

La membrana citoplásmica rodea el citoplasma de la célula y contiene proteínas y fosfolípidos. Muchas de las proteínas contenidas en la membrana celular son enzimas responsables del metabolismo celular. La membrana citoplásmica también sirve como una barrera de permeabilidad y un enlace de permeabilidad para las sustancias que entran en la célula.

Citoplasma y Otros Componentes Internos

El citoplasma celular contiene los cromosomas, ribosomas y otras estructuras internas. La gran mayoría de bacterias tiene un solo cromosoma pero unas pocas, como el *Vibrio cholerae*, tiene dos cromosomas.

ESTRUCTURA DE LAS BACTERIAS GRAM POSITIVAS

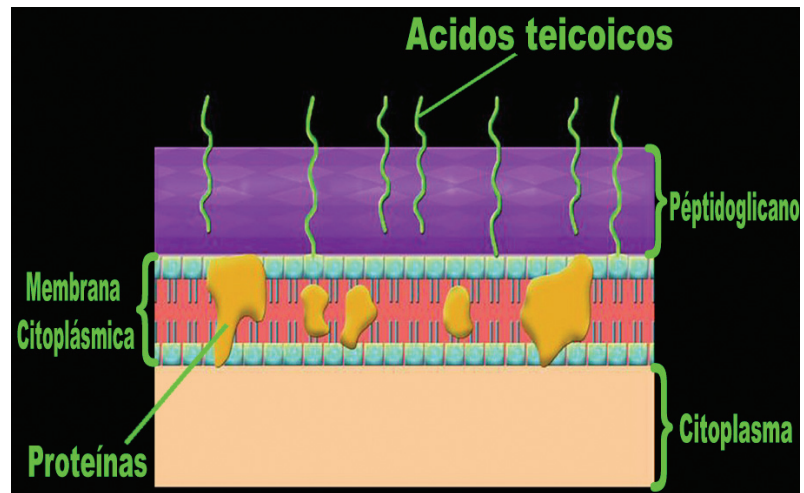


Figura 1.2—Estructura de la pared celular de gram-positiva

Pared Celular

Puesto que la pared celular de las bacterias gram-positivas contiene solo dos componentes principales es mucho menos complicada que la pared celular de las gram-negativas.

- **Ácidos teicoicos** son polímeros que están entrelazados en la capa de péptidoglicano y se extiende en forma de cilios más allá de la superficie de las células gram-positivas. Estos son también importantes antígenos de superficie en aquellos organismos que los poseen.
- La capa de **péptidoglicano**, o capa de mureína, de las bacterias gram-positivas es mucho más gruesa que la de las bacterias gram-negativas. Es responsable de mantener la forma del organismo y por lo general se conoce como la pared celular.

La Membrana Citoplásmica, Citoplasma, y Otros Componentes Internos

Estas estructuras son muy similares tanto en bacterias gram-positivas como en gram-negativas.

AGENTES ANTIMICROBIANOS

Agentes Bacteriostáticos vs. Bactericidas

Los agentes bacteriostáticos tales como tetraciclina inhiben el crecimiento y multiplicación de las bacterias. A partir de la exposición a un agente bacteriostático, las células en una población susceptible cesan su división. Sin embargo, si el agente es retirado, las células vuelven a multiplicarse.

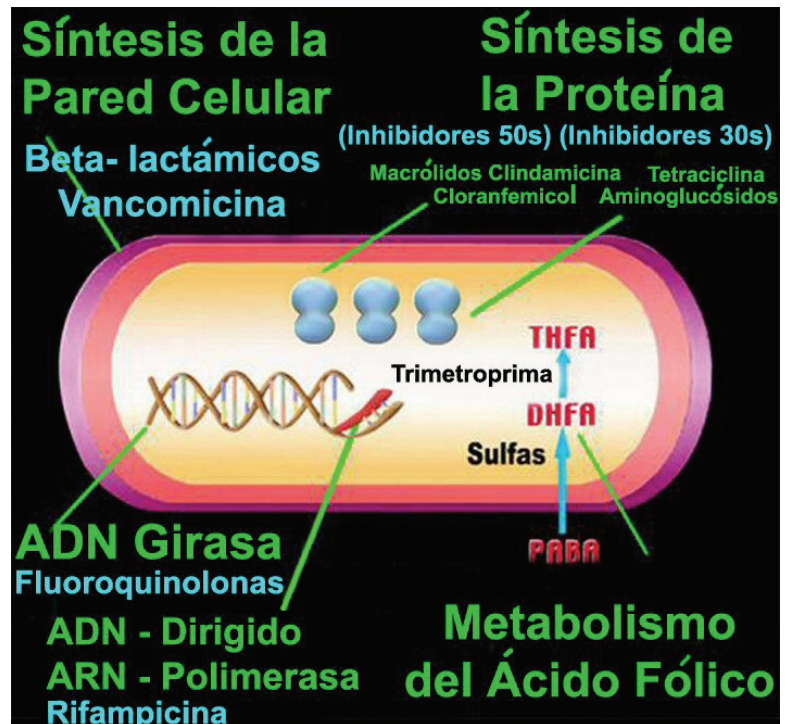


Figura 1.3—Blancos de algunos agentes antimicrobiales

Los agentes bactericidas, como las fluoroquinolonas, no solo inhiben el crecimiento de las células sino también desencadenan mecanismos dentro de la célula que conducen a la muerte celular. Las acciones de los agentes bactericidas son irreversibles por tanto una vez que las células susceptibles son expuestas al agente bactericida, estas mueren.

Modos de Acción de los Antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos se clasifican de acuerdo a sus modos específicos de acción contra las células bacterianas. Estos agentes pueden interferir con la síntesis de la pared celular, inhibir la síntesis de proteínas, interferir con la síntesis de ácido nucleico, o inhibir una ruta metabólica. Los modos de acción de los agentes antimicrobianos contra las bacterias gram-positivas y gram-negativas son muy similares.

- **Interferencia con la Síntesis de la Pared Celular:** Los agentes antimicrobianos que interfieren con la síntesis de la pared celular bloquean la síntesis del péptidoglicano y por tanto son activos contra bacterias en crecimiento. Los agentes antimicrobianos que interfieren con la síntesis de la pared celular son bactericidas.
- **Actividad de los beta lactámicos en bacterias gram-negativas:** En las bacterias gram-negativas, los antimicrobianos beta lactámicos entran a la célula a través de los canales porínicos de la membrana externa. En las células susceptibles, las moléculas beta-lactámicas se unen a las proteínas de unión de penicilina (PBPs) que son enzimas necesarias para la síntesis de la pared celular. La unión de las moléculas beta-lactámicas a las PBPs, ubicadas en la superficie de la membrana citoplásmica, bloquea su función. Esto produce paredes celulares debilitadas o defectuosas y conduce a lisis celular y muerte.

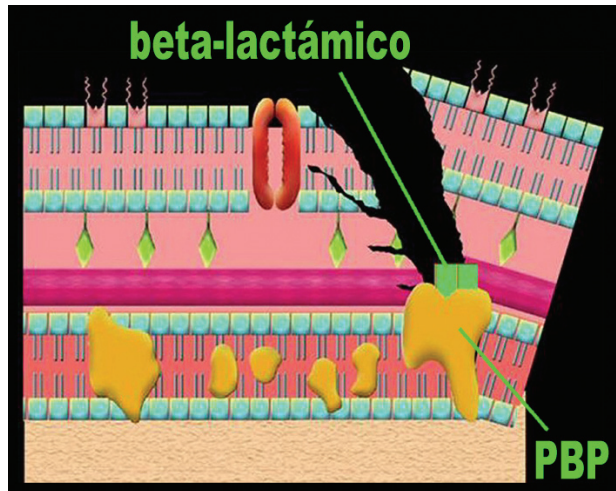


Figura 1.4—Efectos de los beta lactámicos en la pared celular de bacterias gram-negativas

- Actividad de los beta lactámicos en **bacterias gram-positivas**: Puesto que las bacterias gram-positivas no poseen una membrana externa, los antimicrobianos beta lactámicos se difunden a través de la pared celular. Los siguientes pasos son similares a aquellos para las bacterias gram-negativas. En las células susceptibles, las moléculas beta-lactámicas se unen a las PBPs, lo que resulta en paredes celulares debilitadas y lisis celular.
- **Interferencia con la membrana citoplásmica**: Las moléculas de polimixina se difunden a través de la membrana externa y pared celular de células susceptibles hacia la membrana citoplásmica. Estas se unen a la membrana citoplásmica y la alteran y desestabilizan. Esto causa el derrame del citoplasma hacia el exterior de la célula lo que resulta en muerte celular. Los agentes antimicrobianos que interfieren con la membrana citoplásmica son bactericidas.
- **Interferencia con la síntesis de proteínas mediante el enlace a la subunidad ribosómica 30S**:
 - **Las tetraciclinas** (eje. tetraciclina, minociclina y doxiciclina) se unen a la subunidad 30S del ribosoma y bloquean la adherencia del RNA de transferencia (tRNA). Puesto que no se pueden agregar más aminoácidos a la cadena de proteínas que está en crecimiento, la síntesis de proteínas es inhibida. La acción de las tetraciclinas es bacteriostática.
 - **Los aminoglucósidos** (eje. gentamicina, tobramicina, amikacina, y estreptomycin) también se unen a la subunidad 30S del ribosoma y pueden bloquear la síntesis de proteínas de dos maneras diferentes. En primer lugar estos se pueden adherir a la subunidad 30S del ribosoma y prevenir que la subunidad 30S se adhiera al RNA mensajero (mRNA). Segundo, la presencia del aminoglucósido en el ribosoma podría provocar la lectura errada del mRNA. Esto resulta en la inserción de aminoácidos erróneos en la proteína o en la interferencia con la capacidad de los aminoácidos para conectarse unos con otros. Estas actividades por lo general ocurren de manera simultánea y el efecto total es bactericida.
- **Inhibición de la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad ribosómica 50S**.
 - **Los macrólidos** (eje. eritromicina, azitromicina y claritromicina) y las **lincosámidas** (eje. clindamicina) se adhieren a la subunidad ribosómica 50S provocando la terminación del crecimiento de la cadena proteica y la inhibición de la síntesis de proteínas. Estos son primordialmente bacteriostáticos.

- **El cloramfenicol** también se une a la subunidad 50S del ribosoma e interfiere con la unión de aminoácidos a la proteína en crecimiento. Los agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas de esta forma son bacteriostáticos.
- **Inhibición de la síntesis de proteínas mediante mecanismos que al momento están en investigación**
 - **La linezolid** (una oxazolidinona) es un nuevo potente inhibidor de la síntesis de proteínas. Es activa contra una gran variedad de bacterias gram-positivas pero no tiene una actividad clínicamente útil contra las bacterias gram-negativas.
- **La interferencia con la síntesis de ácido nucleico es causada por dos tipos de agentes antimicrobianos**
 - **Las fluoroquinolonas** (eje. ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina y gemifloxacina) interfieren con la síntesis de ADN bloqueando la enzima ADN girasa. La ADN girasa ayuda a enrollar y desenrollar el ADN durante la replicación de ADN. La enzima se adhiere al ADN e introduce rupturas dobles en las cadenas que permiten al ADN desenrollarse. Las fluoroquinolonas se unen al complejo ADN girasa-ADN y permiten a las cadenas de ADN rotas liberarse dentro de la célula lo que conduce a la muerte celular.
 - **La rifampicina** se une a la ARN polimerasa ADN dependiente lo que bloquea la síntesis de ARN y resulta en la muerte de la célula.
- **Inhibición de la ruta metabólica de la síntesis de ácido fólico causada por sulfonamidas y trimetoprima:** Para muchos organismos el ácido para-amino benzoico (PABA) es un metabolito esencial y está involucrado en la síntesis de ácido fólico, un importante precursor para la síntesis de ácidos nucleicos. Las sulfonamidas son estructuras análogas del PABA y compiten con el PABA por la enzima dihidropteroato sintetasa. La trimetoprima actúa en la ruta de síntesis del ácido fólico en un punto posterior al de las sulfonamidas. Este inhibe la enzima dihidrofolato reductasa. La trimetoprima y las sulfonamidas se pueden usar por separado o en conjunto. Cuando se usan en conjunto producen un bloqueo secuencial de la ruta de síntesis del ácido fólico y tienen un efecto sinérgico. Tanto la trimetoprima como las sulfonamidas son bacteriostáticas.

MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Hay una serie de formas en que los microorganismos son resistentes a los agentes antimicrobianos. Estos incluyen: 1) la bacteria produce enzimas que destruyen el agente antimicrobiano antes que este alcance su blanco o modifica el agente antimicrobiano de tal forma que ya no puede ser reconocido por su blanco; 2) la pared celular se vuelve impermeable al agente antimicrobiano; 3) el sitio de ataque es alterado por mutación de tal manera que ya no permite la unión del agente antimicrobiano; 4) la bacteria posee una bomba de eflujo que expulsa al agente antimicrobiano de la célula antes que este alcance su blanco; 5) rutas metabólicas específicas dentro de la bacteria son alteradas genéticamente para que el agente antimicrobiano no pueda provocar un efecto.

Producción de Enzimas

- **Las beta-lactamasas** son enzimas que hidrolizan los agentes antimicrobianos beta-lactámicos. Como resultado la célula es resistente a la acción de los medicamentos beta lactámicos
 - En las bacterias **gram-negativas** los medicamentos beta lactámicos entran en la célula a través de las porinas y encuentran a las beta-lactamasas en el espa-

- cio periplásmico. Las beta-lactamasas destruyen las moléculas beta-lactámicas antes de que éstas tengan la oportunidad de alcanzar sus PBPs blancos.
- En las bacterias **gram-positivas** las beta-lactamasas son secretadas extracelularmente en el medio circundante y destruyen las moléculas beta-lactámicas antes de que estas tengan oportunidad de entrar en la célula.
 - **Enzimas que modifican los aminoglucósidos:** Las bacterias gram-negativas pueden producir enzimas adenilantes, fosforilantes o acetilantes que modifican un aminoglucósido para inactivarlo.
 - **Cloranfenicol acetil transferasa:** Las bacterias gram-negativas pueden producir una acetil transferasa que modifica al cloranfenicol para inactivarlo.
 - **Impermeabilidad de la Membrana Bacteriana Externa**
 - **Alteración de porinas** en bacterias gram-negativas:
 - Las bacterias gram-negativas pueden volverse resistentes a los antibióticos beta-lactámicos mediante el desarrollo de barreras de permeabilidad. Esto es usualmente provocado por porinas alteradas en la membrana externa que ya no permiten la entrada y el tránsito de las moléculas del antibiótico dentro de la célula. Cuando los beta-lactámicos no pueden alcanzar las PBPs, la célula es resistente.
 - **Alteración de los Blancos**
 - **Las PBPs** tanto en bacterias gram-positivas y gram-negativas pueden ser alteradas mediante mutación de manera que los beta-lactámicos no puedan unirse a ellas; por tanto la célula es resistente a agentes antimicrobianos.
 - **Los ribosomas.** La metilación del ARN ribosómico confiere resistencia a los macrólidos.
 - **ADN girasa y topoisomerasa IV.** Mutaciones en los genes cromosómicos de ADN girasa y topoisomerasa IV confieren resistencia a las quinolonas.
 - **Bombas de eflujo:**
 - Una amplia variedad de bombas de eflujo proveen resistencia antimicrobiana tanto en bacterias gram-positivas como en gram-negativas. El eflujo activo de antibióticos es mediado por proteínas trans-membrana insertadas en la membrana citoplásmica y, en el caso de los organismos gram-negativos involucra también componentes en la membrana externa y periplasma. Estas proteínas forman canales que exportan activamente a un agente antimicrobiano fuera de la célula tan rápido como entra.
 - **Alteración de Rutas Metabólicas**
 - Algunos microorganismos desarrollan una ruta metabólica alterada que elude la reacción inhibida por el antimicrobiano. Mutaciones que inactivan la timidilato sintetasa bloquean la conversión de deoxiuridilato a timidilato. Estos mutantes requieren timina o timidina exógena para la síntesis de ADN y por ende son resistentes a los antagonistas de la ruta del folato como las sulfonamidas y trimetoprima.

RESISTENCIA INTRÍNSECA VS. ADQUIRIDA

En algunas especies la resistencia antimicrobiana es una propiedad **intrínseca o innata**. Esta resistencia intrínseca podría deberse a uno o más de los mecanismos de resistencia anteriormente descritos. Por ejemplo, *E. coli* es intrínsecamente resistente a la vancomicina porque la vancomicina es demasiado grande para pasar a través de los canales de porinas en sus membrana externa. Las bacterias gram-positivas, en cambio, no poseen una membrana externa y por lo tanto no son intrínsecamente resistentes a la vancomicina.

Las bacterias también pueden **adquirir resistencia** a los agentes antimicrobianos por eventos genéticos como mutación, conjugación, transformación, transducción y transposición.

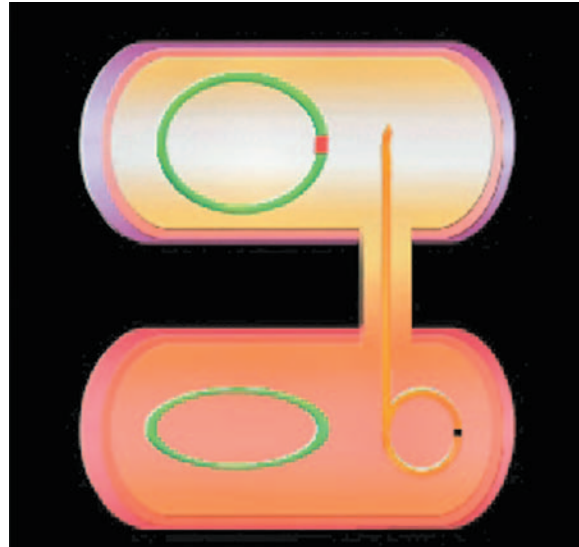


Figura 1.5—Plásmido entrando a una célula

- **Mutación.** La resistencia cromosómica se desarrolla como resultado de una mutación espontánea en un locus que controla la susceptibilidad a un determinado agente antimicrobiano. La mutación espontánea ocurre con una frecuencia relativamente baja, pero cuando las bacterias son expuestas a los agentes antimicrobianos, solo las células mutantes sobreviven. Entonces estas se multiplican y resultan en la aparición de una población resistente. Las mutaciones espontáneas también podrían ocurrir en plásmidos. Por ejemplo, mutaciones en plásmidos que contienen genes para enzimas beta-lactamasas pueden resultar en beta-lactamasas alteradas por lo general con mayor espectro de actividad.
- **Conjugación.** Las bacterias con frecuencia contienen elementos genéticos extracromosómicos llamados plásmidos, muchos de los cuales llevan genes de resistencia antimicrobiana. Cuando dos células bacterianas se encuentran cerca, una estructura similar a un puente conocida como pilus se puede formar entre ellas. Esto permite que una copia del plásmido se replique y transfiera de una célula a la otra. El resultado es una bacteria que expresa la resistencia antimicrobiana codificada en el plásmido.
- **Transformación.** Las bacterias podrían encontrar fragmentos desnudos de ADN que transportan genes de resistencia antimicrobiana. Estos fragmentos son introducidos en la célula mediante un proceso denominado transformación. El fragmento de ADN es incorporado en el cromosoma de la célula huésped por recombinación y la célula resultante es resistente.
- **Transducción.** Cuando los virus bacterianos (bacteriófagos) se están multiplicando en el citoplasma de una bacteria, fragmentos de ADN de plásmidos o cromosomas podrían por casualidad empacarse en una cápsula viral y entrar en otra célula huésped. Cuando los fragmentos contienen genes de resistencia a un agente antimicrobiano estos pueden traspasar la resistencia a la nueva célula huésped.
- **Transposición.** Los transposones son secuencias genéticas especializadas “móviles” que tienen la capacidad de moverse de un área del cromosoma bacteriano a otra o entre cromosomas y plásmidos o ADN de bacteriófagos. Los transposones de ADN pueden estar incorporados a plásmidos y de esa manera transportar genes de resistencia antimicrobiana. Algunos transposones son capaces de moverse de una bacteria a otra sin incorporarse a un cromosoma, un plásmido o un bacteriófago.

REVISIÓN

El lector ahora debe entender como grupos específicos de agentes antimicrobianos inhiben el crecimiento bacteriano y los mecanismos mediante los cuales las bacterias desarrollan resistencia a estos agentes antimicrobianos.

Recuerde que:

- No todo agente antimicrobiano es igualmente efectivo contra bacterias gram-positivas y gram-negativas. Las diferencias en las estructuras de estos dos grupos son las responsables por las diferencias en sus patrones de susceptibilidad.
- Los agentes antimicrobianos que están dentro de la misma clase típicamente tienen modos de acción similares.
- Los modos de acción de los agentes antimicrobianos incluyen inhibición de la síntesis de la pared celular, replicación de ADN, síntesis de proteínas y rutas metabólicas.
- La información genética podría ser traspasada de una bacteria a otra por cuatro mecanismos: conjugación, transformación, transducción y transposición.

ESTUDIO DE CASO 1

Presentación

Una mujer de 27 años de edad acude adonde su médico con una frecuencia urinaria aumentada y dolor al orinar. Con base en los síntomas su médico le diagnostica una infección de las vías urinarias (IVU) y le prescribe un régimen de 3 días de trimetoprima-sulfamethoxazole. Esta es la tercera infección de vías urinarias que ella ha tenido en los últimos 12 meses, todas tratadas con el mismo antimicrobiano. Al día siguiente ella se sintió mucho mejor y decidió no continuar con el antibiótico. Una semana después acudió al Departamento de Emergencia (DE) con dolor en el flanco, fiebre, escalofríos y frecuencia urinaria aumentada. Un cultivo de orina realizado en el DE resultó positivo con >100,000 colonias/mL de *E. coli*. Las pruebas de susceptibilidad revelaron que el aislamiento era resistente a trimetoprima-sulfamethoxazole. ¿Cuáles son las posibles explicaciones para las continuas IVUs y el empeoramiento de los síntomas?

Discusión

Inicialmente lo más probable es que esta paciente sufrió de una cistitis (infección de la vejiga). *E. coli* es la causa más común de IVUs no complicadas, especialmente en mujeres. Parece que en el pasado no se realizó un cultivo. A pesar de que en primera instancia no deberían haberse realizado cultivos en una IVU no complicada, las infecciones repetidas deberían haber inducido un cultivo para determinar la identidad del patógeno y su patrón de susceptibilidad. Esta paciente terminó desarrollando una pielonefritis (infección del riñón) como se evidencia por su fiebre, escalofríos y dolor en el flanco. Es importante distinguir entre cistitis y pielonefritis ya que la pielonefritis es más seria y requiere terapia prolongada.

Esta paciente tuvo IVUs previas por las cuales recibió repetidamente trimetoprima-sulfamethoxazole. Uno de los efectos deletéreos asociado con el uso de agentes antimicrobianos es el desarrollo de resistencia. Esto puede haber sido un resultado de la transferencia de plásmidos entre organismos intestinales como respuesta a la presión ejercida por los antimicrobianos recibidos por el tratamiento repetido con el mismo agente antimicrobiano o la persistencia de organismos en sus vías urinarias debido a su incumplimiento con la terapia.

En esta instancia, el cultivo de orina y las pruebas de susceptibilidad identificaron el patógeno así como los antimicrobianos apropiados para la terapia.

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

1. VERDADERO o FALSO
La pared celular es un buen blanco para la acción antimicrobiana debido a la diferencia entre la estructura de las células bacterianas y las células mamíferas.
2. ¿Cuál de los ejemplos describe de mejor manera el *concepto* de resistencia antimicrobiana emergente?
 - A. La transferencia de plásmidos bacterianos que contienen genes de resistencia mediante conjugación.
 - B. La incidencia creciente de resistencia a una variedad de agentes antimicrobianos en una variedad de especies bacterianas.
 - C. El incremento en el número de infecciones MRSA.
3. ¿Cuál de las siguientes afirmaciones describe los plásmidos bacterianos? Seleccione todas las que apliquen.
 - A. Estos resultan de mutaciones cromosómicas.
 - B. Estos son ADN extracromosómico.
 - C. Estos podrían contener genes de resistencia.
 - D. Estos podrían ser fácilmente transferidos entre bacterias.
 - E. Estos están frecuentemente presentes en bacterias que causan infecciones.
4. Conteste lo siguiente como Verdadero o Falso.
 - A. La pared celular de las bacterias gram-positivas es más gruesa que la pared celular de las bacterias gram-negativas.
 - B. La variedad de antimicrobianos fluoroquinolonas actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular.
 - C. El eflujo está asociado con el bombeo de antimicrobianos fuera de la célula.
 - D. Cambios en las proteínas que se unen a la penicilina conducen a hidrólisis o desactivación de los agentes beta-lactámicos.
 - E. Cambios en las porinas con frecuencia limitan la cantidad de agentes antimicrobianos que pueden entrar en la célula.
 - F. Las beta-lactamasas podrían ser transportadas fuera de la célula y actuar extracelularmente en algunos organismos.
5. ¿Cuál de las siguientes presiones selectivas contribuyen a la resistencia antimicrobiana emergente? Seleccione todas las que apliquen.
 - A. Tomando penicilina para infecciones virales.
 - B. Tomando solo 3 días de un régimen de 7 días de ciprofloxacina.
 - C. Incrementando el consumo de vitamina C.
6. Relacione los siguientes antimicrobianos con su modo de acción

A. Inhibición de la síntesis de proteínas	(1) Cefalosporinas
B. Inhibición de la síntesis de ADN	(2) Aminoglucósidos
C. Inhibición de la ruta del ácido fólico	(3) Quinolonas
D. Inhibición de la síntesis de la pared celular	(4) Trimethoprim

-
7. Indique si los siguientes antimicrobianos son (1) bacteriostáticos o (2) bactericidas:
- A. Ciprofloxacina
 - B. Tetraciclina
 - C. Gentamicina
 - D. Sulfamethoxazole
8. Relacione los siguientes antimicrobianos con su mecanismo de resistencia bacteriana
- | | |
|--|---------------------|
| A. Porinas alteradas | (1) Sulfonamidas |
| B. Alteración de ribosomas | (2) Aminoglucósidos |
| C. Ruta metabólica alterada | (3) Macrólidos |
| D. Producción de enzimas modificadoras | (4) Beta-lactámicos |

2

Beta-Lactamasas

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Analizar la clasificación de las beta-lactamasas.
- Describir las diferencias entre la producción inducible y constitutiva de beta-lactamasas.
- Listar los organismos que deben ser examinados en forma rutinaria para detectar la producción de beta-lactamasas.

BETA-LACTAMASAS—GENERAL

Las beta-lactamasas son enzimas producidas por bacterias que inactivan los beta-lactámicos al hidrolizar el anillo beta-lactámico de los mismos. La mayoría de beta-lactamasas inactivan ya sea penicilinas o cefalosporinas pero algunas son capaces de inactivar ambos tipos de antibióticos.

La mayoría de bacterias gram-positivas secretan sus beta-lactamasas de forma que los agentes antimicrobianos beta-lactámicos son inactivados extracelularmente, en el medio que las rodea.

En contraste, las beta-lactamasas de las bacterias gram-negativas permanecen dentro de la célula e inactivan los beta-lactámicos en el espacio periplásmico, esto es, en el espacio entre la membrana externa y la membrana citoplásmica.

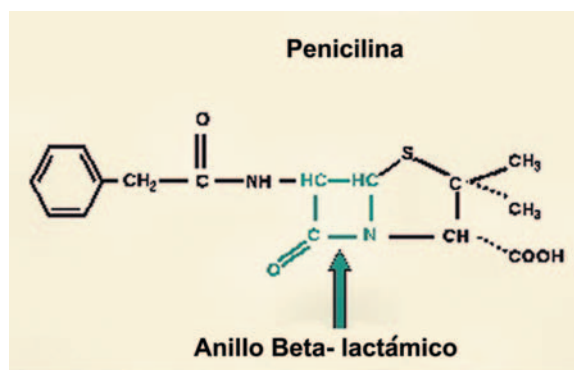


Figura 2.1—Molécula de Penicilina con el anillo beta-lactámico resaltado

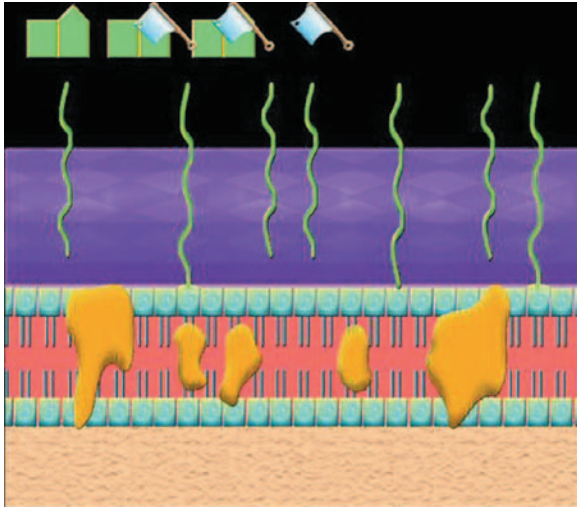


Figura 2.2—Beta-lactamasas en organismos Gram positivos

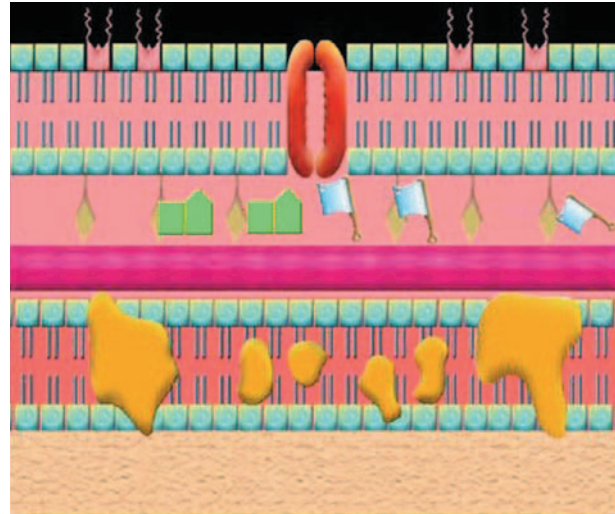


Figura 2.3—Beta-lactamasas en organismos Gram negativos

Los genes que codifican a las beta-lactamasas pueden ubicarse en el cromosoma bacteriano, en los plásmidos o en los elementos de transposición. Por ejemplo:

- El gene de beta-lactamasa que media en la resistencia del *Staphylococcus aureus* a la penicilina está típicamente ubicado en un plásmido.
- El gene de beta-lactamasa que media en la resistencia del *Klebsiella pneumoniae* a la ampicilina y ticarcilina está ubicado en un cromosoma.
- Los plásmidos y elementos de transposición refuerzan la diseminación de genes de beta-lactamasa entre una variedad de especies bacterianas.

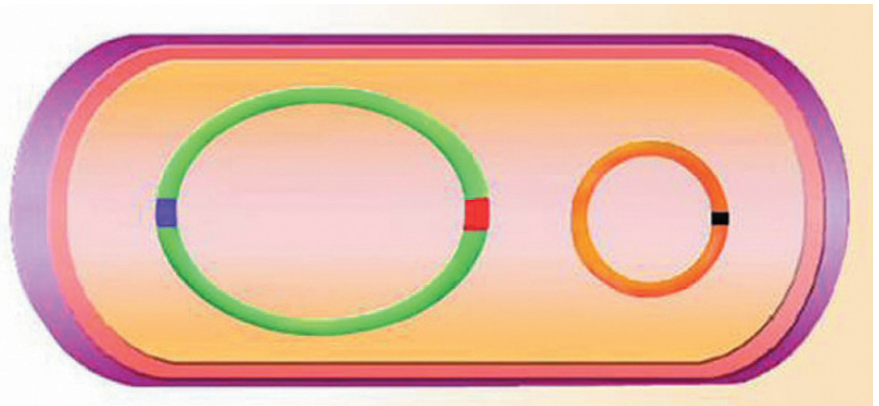


Figura 2.4—Bacteria con cromosoma circular y plásmido

CLASIFICACIÓN DE LAS BETA-LACTAMASAS

Se han propuesto varios modelos de clasificación para las beta-lactamasas de acuerdo con su espectro de hidrólisis, susceptibilidad a inhibidores, ubicación en genes (plásmido o cromosoma), y secuencia de genes o de proteínas.

Existen dos sistemas principales de clasificación:

La clasificación de Ambler se basa en la estructura molecular de la beta-lactamasa y su secuencia de aminoácidos. Esta clasificación que, en forma inicial, fue introducida por Ambler en 1980, reconoce cuatro tipos moleculares designados A hasta D. Los tipos A, C y D incluyen grupos de enzimas relacionados por su evolución que poseen serina en su zona activa. Las beta-lactamasas de tipo B tienen una o dos moléculas de zinc en su zona activa y son inhibidas por EDTA.

La clasificación de Bush se basa en los sustratos que la beta-lactamasa hidroliza y en la inhibición de su actividad por compuestos como el ácido clavulánico, EDTA, y aztreonam u oxacilina. Este modelo funcional de clasificación de las beta-lactamasas, propuesto por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995, define los cuatro siguientes grupos de acuerdo a los sustratos hidrolizados y perfiles de inhibición.

- Grupo 1—cefalosporinasas que no son adecuadamente inhibidas por el ácido clavulánico.
- Grupo 2—penicilinasas, cefalosporinasas y carbapenemasas que generalmente son inhibidas por inhibidores de beta-lactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Los subgrupos también se definen de acuerdo a las tasas de hidrólisis de carbenicilina o cloxacilina (oxacilina) producidas por las penicilinasas del Grupo 2.
- Grupo 3—metalo-beta-lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, y carbapenems que son inhibidas por EDTA y no por inhibidores estructuralmente relacionados a los beta-lactámicos.
- Grupo 4—penicilinasas que no son inhibidas adecuadamente por el ácido clavulánico.

Beta-lactamasas—Inducible

La producción de beta-lactamasa inducible se inicia o induce cuando las bacterias que poseen un gene de beta-lactamasa se exponen a un agente beta-lactámico. La acción de los agentes antimicrobianos en la pared celular activa un mecanismo genético en cascada que inicia la producción de beta-lactamasa. La producción de beta-lactamasa cesa ante la ausencia de los agentes antimicrobianos en la pared celular o alrededor de ella.

Beta-lactamasas—Constitutiva

Beta-lactamasas constitutivas son aquellas que la bacteria produce en forma continua. Un ejemplo de producción de beta-lactamasa constitutiva es la enzima cromosómica SHV-1 de *K. pneumoniae* que interviene en la resistencia a la ampicilina y ticarcilina.

Beta-lactamasas –Grupo 2 de Bush

Muchas beta-lactamasas se reúnen en subgrupos del Grupo 2 de Bush.

Ejemplos de **beta-lactamasas de amplio espectro** incluyen las enzimas plasmídicas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 que intervienen en la resistencia a la ampicilina y 1^{ra} generación de cefalosporinas en *Enterobacteriaceae*. Las siglas TEM se derivan de las iniciales del primer paciente en quien fue aislada una *E. coli* productora de beta-lactamasa en 1965. La SHV es considerada un pariente lejano de la TEM, las siglas se derivan de la clasificación inicial como una “variedad sulfidriilo”.

Grupo Funcional de Bush, Jacoby-Medeiros		Molecular de Ambler Tipo	Atributos de las Beta-Lactamasas en el Grupo Funcional
Grupo	Subgrupo		
1		C	AmpC beta-lactamasas en bacteria gram-negativa. Los genes a menudo son cromosómicos pero pueden ser plásmido-codificados. Confiere resistencia a todos los tipos de beta-lactámicos, excepto los carbapenemes (a menos que se combinen con cambios en porinas). No son inhibidas por el ácido clavulánico.
2		A, D	La mayoría de enzimas del Grupo 2 son inhibidas por el ácido clavulánico (a menos que se indique lo contrario).
	2a	A	Incluyen penicilinas estafilocócica y enterocócica. Confiere alta resistencia a las penicilinas.
	2b	A	Beta-lactamasas de amplio espectro, incluyen TEM-1 y SHV-1, primordialmente de bacterias gram negativas.
	2be	A	Las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) confieren resistencia a las penicilinas, oximino-cefalosporinas y monobactámicos.
	2br	A	Beta-lactamasas tipo TEM (IRT) y una tipo SHV que son resistentes a los inhibidores.
	2c	A	Enzimas que hidrolizan la carbenicilina.
	2d	D	Enzimas que hidrolizan la cloxacilina-(oxacilina)-; inhibidas moderadamente por el ácido clavulánico.
	2e	A	Cefalosporinas.
	2f	A	Enzimas que hidrolizan los carbapenemes con serina en la zona activa.
3	3a, 3b, 3c	B	Metalo-beta-lactamasas que confieren resistencia a los carbapenemes y todos los tipos de beta-lactámicos excepto los monobactames. No inhibidas por el ácido clavulánico.
4		?	Penicilinasas misceláneas que no caben en otros grupos. No son inhibidas por el ácido clavulánico.

^a Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A Functional Classification Scheme for Beta-lactamases and its Correlation to Molecular Structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211–1233.

El gene bla_{TEM-1} (esto es, el gene de beta-lactamasa que codifica la beta-lactamasa TEM-1) es responsable de:

- La resistencia a la ampicilina en *Enterobacteriaceae* y *Haemophilus influenzae*
- La resistencia a la penicilina en *Neisseria gonorrhoeae*

El gene bla_{SHV-1} que codifica las beta-lactamasas tipo SHV-1 también es responsable de la resistencia a la ampicilina en *Enterobacteriaceae*.

Las **beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs)** son enzimas que hidrolizan y generan resistencia a beta-lactámicos nuevos especialmente oximino-cefalosporinas y aztreonam. La mayoría de BLEEs son derivadas de las ampliamente difundidas beta-lactamasas TEM-1 y SHV-1. En la actualidad se han identificado al menos 160 BLEEs que en su mayoría se han asignado a los grupos TEM o SHV en números secuenciales.

Una de las características principales de las beta-lactamasas del Grupo 2 es su inhibición por el ácido clavulánico que se une a las beta-lactamasas e interfiere con la hidrólisis de los beta-lactámicos.

MÉTODOS DE PRUEBA—BETA-LACTAMASA

Las pruebas para beta-lactamasa determinan si los agentes beta-lactámicos de espectro limitado (eje. penicilina y ampicilina) pueden ser utilizados para tratar unas pocas especies claves de bacterias.

Las pruebas para beta-lactamasa **NO DEBEN** ser utilizadas para detectar BLEES, beta-lactamasas AmpC, metalo-beta-lactamasas, o carbapenemasas.

Las especies para las cuales las pruebas de beta-lactamasa son útiles incluyen:

Especie *Enterococcus*

Haemophilus influenzae

Moraxella catarrhalis

Neisseria gonorrhoeae

Especie *Staphylococcus*.

Algunas bacterias anaeróbicas

(Más detalles se ofrecen en capítulos posteriores.)

Para detectar *in vitro* una beta-lactamasa inducible, como la que se encuentra en la mayoría de cepas de *Staphylococcus aureus*, el *S. aureus* aislado se inocula en un medio de agar. Luego se coloca un disco de oxacilina en la placa de Petri y se incuba durante la noche. Al día siguiente, se toma una muestra del crecimiento ubicado en la periferia de la zona de inhibición alrededor del disco (esto es, donde se indujo la producción de beta-lactamasa) y se usa para la prueba de beta-lactamasa. La prueba más común de beta-lactamasa usa un sustrato beta-lactámico cromogénico (como una cefalosporina) que cambia de color cuando su anillo beta-lactámico es hidrolizado:

Procedimiento:

1. Inocular una gran cantidad de los organismos a examinar en el papel filtro impregnado de sustrato beta-lactámico cromogénico (usar un asa de inoculación).
2. Incubar por el tiempo y a la temperatura (por lo general temperatura ambiente) indicados por el fabricante.

Especies diferentes podrían requerir diferentes tiempos de incubación.

Muchas reacciones ocurren en forma instantánea.

3. Observe si hay un cambio de color.

Negativo = no hay cambio de color

Positivo = cambio de color, por lo general de incoloro o amarillo a rojo

Interpretación: Un resultado positivo indica resistencia a:

Amoxicilina

Ampicilina

Carbencilina

Mezlocilina

Penicilina

Piperacilina

Ticarcilina

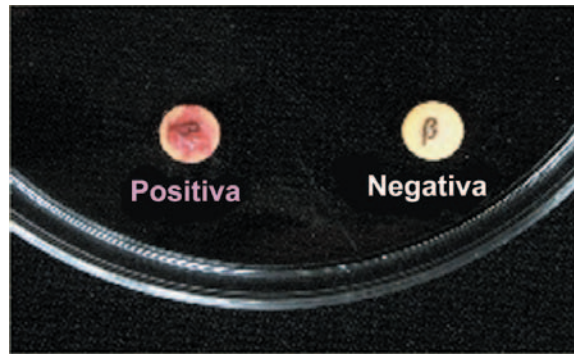


Figure 2.5—Pruebas beta-lactamasa negativas y positivas

Los anteriores beta-lactámicos son hidrolizados por los tipos de beta-lactamasas que se identifican con la prueba rutinaria de beta-lactamasa.

Una reacción negativa no siempre significa que el organismo es susceptible a los agentes mencionados anteriormente. Algunas bacterias tienen mecanismos múltiples de resistencia a los agentes beta-lactámicos. Por ejemplo, la *Neisseria gonorrhoeae* puede ser resistente a la penicilina debido a la producción de beta-lactamasa o por alteraciones de las proteínas de unión de penicilina (PBPs). Para confirmar la resistencia a la penicilina debida a PBPs alteradas se necesita pruebas convencionales de susceptibilidad antimicrobiana.

REVISIÓN

El lector ahora debe entender la acción de las beta-lactamasas y los métodos de rutina que se utilizan para identificar a la beta-lactamasa en el laboratorio clínico de microbiología.

Recuerde:

Existen muchos tipos diferentes de beta-lactamasas y su espectro de actividad es bastante variable. El ensayo de cefalosporina cromogénica para beta-lactamasas, usado con frecuencia en el laboratorio clínico de microbiología, es útil solo para especies de *Enterococcus*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *N. gonorrhoeae*, y especies de *Staphylococcus*. No ayuda para la determinación de actividad de beta-lactamasa en bacterias aisladas que no pertenezcan a estas especies.

CASO DE ESTUDIO

Presentación:

Una mujer lleva al médico a su niña de 2 años de edad por presentar dolor de oído, supuración ótica, fiebre, letargia e irritabilidad. Luego de examinar a la niña el médico explica a la madre que la niña tiene una infección del oído. El médico le receta a la niña amoxicilina por 7 días. Luego de 5 días, la madre regresa con su niña a la consulta del médico. La niña no ha mejorado y todavía tiene dolor y fiebre. El médico cambia la prescripción a amoxicilina/clavulanato (Augmentin) y los síntomas desaparecen. ¿Cuáles son las posibles explicaciones de la falta de respuesta inicial de esta niña al tratamiento y su posterior recuperación?

Discusión:

Las causas bacterianas de otitis media en infantes, niños y adultos incluyen principalmente *S. pneumoniae* (40–50%), *H. influenzae* (20–25%) y *M. catarrhalis* (10–15%). La amoxicilina se mantiene como el medicamento de elección para el tratamiento inicial debido a su historia de 25 años de éxito clínico, aceptación, reducidos efectos colaterales y relativo bajo costo. Sin embargo, el medicamento no es efectivo contra *M. catarrhalis* y cepas de *H. influenzae* productoras de beta-lactamasa. La incidencia actual de otitis media causada por *H. influenzae* y *M. catarrhalis* resistentes a la ampicilina no es lo suficientemente alta como para requerir otro medicamento diferente a la amoxicilina en el tratamiento inicial. Sin embargo, los padres o las madres deben ponerse en contacto con el médico si el/la niño/niña no responde al tratamiento.

La infección en esta niña probablemente se debió a una cepa de *H. influenzae* or *M. catarrhalis* productora de beta-lactamasa. Esto explicaría la falla inicial del tratamiento con amoxicilina y la posterior respuesta a la amoxicilina + clavulanato. El clavulanato es un potente inhibidor de la enzima beta-lactamasa producida por *H. influenzae* and *M. catarrhalis*, neutralizando sus efectos y permitiendo que la amoxicilina mate a los organismos.

Si se hubiera realizado un cultivo de esta paciente que diese como resultado *H. influenzae* o *M. catarrhalis*, se podría haber realizado un ensayo de cefalosporina cromogénica para detectar rápidamente la producción de la enzima beta-lactamasa.

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

1. Responda verdadero o falso a los siguientes enunciados.
 - A. Las bacterias gram-positivas producen beta-lactamasas que destruyen los beta-lactámicos fuera de la célula.
 - B. Las beta-lactamasas TEM solo son producidas por estafilococos.
 - C. Las beta-lactamasas TEM son producidas por especies gram-negativas, que incluyen *Enterobacteriaceae*, *H. influenzae* y *N. gonorrhoeae*.
 - D. Las beta-lactamasas constitutivas son producidas a los mismos niveles sin que importe la exposición de la bacteria a agentes beta-lactámicos.
 - E. La clasificación Ambler de las beta-lactamasas se basa en el grado en que la beta-lactamasa hidroliza o inactiva la penicilina.
2. ¿A cuál o cuáles de los siguientes agentes antimicrobianos es resistente un *H. influenzae* productor de beta-lactamasas? Marque todas las opciones que correspondan.
 - A. Amoxicilina
 - B. Ampicilina
 - C. Cefotaxima
 - D. Ciprofloxacina
 - E. Imipenem
 - F. Penicilina

II

Metodos de Prueba

3

Guía para Usar los Documentos NCCLS

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Estar familiarizado con la organización del NCCLS y su misión.
- Seleccionar agentes antimicrobianos apropiados para analizar e informar después de tomar en consideración el organismo, el vademécum del hospital y el sitio de infección.
- Usar los criterios de interpretación que se encuentran en los estándares NCCLS para reportar resultados de susceptibilidad.

Para entender la información contenida en este capítulo es esencial que el lector tenga a mano los documentos NCCLS M2, M7 y M100.



El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), anteriormente conocido como “El Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS),” es una organización sin fines de lucro con miembros que representan múltiples disciplinas. Su misión es promover el desarrollo y el uso voluntario de estándares y guías consensuados de laboratorio.

DOCUMENTOS DEL NCCLS SOBRE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

El NCCLS produce documentos que abordan varios tópicos de la ciencia de laboratorio clínico, tales como análisis de glucosa en muestras de suero y la protección de

los trabajadores de laboratorio ante patógenos transmitidos por sangre, entre otros. Los documentos para los análisis y reportes de rutina para susceptibilidad antimicrobiana son desarrollados por un subcomité que incluye expertos en enfermedades infecciosas, medicamentos y prácticas de laboratorio clínico.

Otros documentos para pruebas más especializadas de susceptibilidad antimicrobiana son manejados por subcomités separados.

ESQUEMA DE NUMERACIÓN NCCLS

Todo lo que el lector necesita saber sobre la realización de pruebas de rutina de susceptibilidad antimicrobiana, desde la selección del medio de cultivo hasta el control de calidad, se puede encontrar en los estándares NCCLS.

- M2 Estándares de desempeño para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por disco
- M6 Protocolos para evaluar el agar Mueller-Hinton deshidratado
- M7 Métodos para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por dilución para bacterias aeróbicas
- M11 Métodos para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias anaeróbicas
- M23 Desarrollo de criterios y parámetros de control de calidad para pruebas de susceptibilidad *in vitro*
- M39 Análisis y presentación de datos acumulativos de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana
- M100 Estándares de desempeño para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana
- M21 Metodología para la prueba bactericida del suero
- M24 Prueba de susceptibilidad de *Micobacteria*, *Nocardia* y otros Actinomicetes aeróbicos
- M26 Métodos para determinar la actividad bactericida de los agentes antimicrobianos
- M27 Método de referencia para pruebas de susceptibilidad antifúngica de levaduras por dilución en caldo
- M31 Estándares de desempeño para pruebas de disco y de dilución de susceptibilidad para bacterias aisladas en animales.
- M37 Desarrollo de criterios y parámetros de control de calidad para pruebas de susceptibilidad *in vitro* para agentes antimicrobianos veterinarios
- M38 Método de referencia para pruebas de susceptibilidad antifúngica por dilución en caldo de conidios que forman hongos filamentosos

NOTA: a lo largo de este manual discutiremos muchas cuestiones relacionadas con la resistencia antimicrobiana y las pruebas de susceptibilidad, incluyendo el uso de los estándares NCCLS. Para obtener el máximo beneficio mientras avanza en este capítulo, el lector debe remitirse a los estándares más recientes del NCCLS. Extractos de los documentos del NCCLS se incluyen solo como ejemplos. Para mayor información sobre como obtener los documentos del NCCLS, visite la página web <http://www.nccls.org>.

El NCCLS usa esquemas específicos para numerar los documentos. Por ejemplo, en el documento M2-A7:

M— significa un documento de Microbiología

2— es el número asignado por el NCCLS para el documento específico sobre pruebas de difusión por disco

A—significa que es un documento aprobado

7—indica que esta es la 7^{ma} edición del documento M2



Figura 3.1—Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

ESTÁNDARES M2 & M7

El documento M2 describe como realizar la prueba de difusión por disco y el M7 describe como realizar la prueba de concentración inhibitoria mínima (CIM) para bacterias aeróbicas. Tanto el M2 como el M7 tienen una página de contenido para orientar al lector/a sobre información específica. Por ejemplo, para ver las instrucciones de cómo leer cultivos e interpretar resultados en el M2, el lector debe ir a la sección 5.4.

Si un documento ha sido revisado, los cambios de la edición anterior están listados al comienzo del documento.

En los Estados Unidos, cualquier dispositivo comercial de diagnóstico utilizado para examinar pacientes en un laboratorio clínico registrado debe ser aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). Para que un dispositivo para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana reciba aprobación, el fabricante debe demostrar que su producto genera resultados comparables con el método de referencia del NCCLS. Cuando se use un sistema comercial, las recomendaciones del fabricante deben seguirse con precisión.

El Documento NCCLS M100 contiene tablas para interpretar los resultados de las pruebas de difusión por disco y CIM.

En este capítulo nos concentraremos en las tablas de difusión por disco, pero resaltaremos diferencias claves entre las tablas de difusión por disco y CIM mientras avanzamos en los diferentes tópicos. La introducción al comienzo de las tablas explica parte de la terminología y describe como usarlas de la mejor manera.

Revisiones de Documento

Los documentos M2 y M7 son revisados cada tres años. Sin embargo, debido a que nuevos antimicrobianos y límites de interpretación podrían ser introducidos frecuentemente, el NCCLS actualiza las tablas en M100 cada enero. Para asegurarse de poseer los más recientes estándares M2 y M7, los lectores deben consultar el sitio web del NCCLS (<http://www.nccls.org>).

Contenido de las Tablas en el Documento M100

Hay tres tipos de tablas:

Las tablas 1 y 1A sugieren antimicrobianos para pruebas y reportes

Las tablas 2A-2J contienen criterios para interpretación de resultados

Las tablas 3 y 3A definen los límites aceptables para organismos de control de calidad (cepas patrón ATCC)

El Glosario I detalla en forma individual los agentes antimicrobianos dentro de las diferentes clases
 Glosario II suministra las abreviaciones de los agentes y las vías de administración.

Tablas 1 & 1A

La tabla 1 sugiere antimicrobianos para pruebas y reportes en bacterias “no fastidiosas”. Se debe tomar en cuenta que los antimicrobianos listados para *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa* son diferentes.

Los antimicrobianos se dividen en los Grupos A, B y C conforme estos deben ser usados para pruebas y reportes de forma rutinaria o selectiva. Los antimicrobianos del Grupo U son solo para aislamientos de orina.

La tabla 1A es similar a la Tabla 1, pero aborda los organismos “fastidiosos”. En general, las tablas 1 y 1A son muy similares para pruebas de difusión por disco y CIM. Sin embargo, siempre refiérase a los cuadros específicos para el método que esté utilizando. Para algunas combinaciones de medicamento/organismo, como cefotaxima y *Streptococcus pneumoniae* sólo la prueba de CIM es apropiada ya que la de difusión por disco no es confiable para esta combinación.

Todos los cuadros contienen notas de pie de página y comentarios importantes y esenciales, los que deben ser revisados para la correcta interpretación y reporte.

Tablas 2A hasta 2H

Las tablas 2A hasta 2H contienen los criterios de interpretación del diámetro de zona para susceptible, intermedia y resistente de los ocho principales grupos de organismos vistos en las tablas 1 y 1A. Estos incluyen:

Organismos no fastidiosos	Organismos fastidiosos
2A. <i>Enterobacteriaceae</i>	2E. <i>Haemophilus</i> spp.
2B. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^a	2F. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
2C. <i>Staphylococcus</i> spp	2G. <i>Streptococcus pneumoniae</i>
2D. <i>Enterococcus</i> spp.	2H. <i>Streptococcus</i> spp.

^a y otras no *Enterobacteriaceae*

Tablas con criterios de interpretación para organismos no incluidos en las tablas 1 y 1A:

2I. *Vibrio cholerae*

2J. *Helicobacter pylori* [Solo Estándares de Interpretación para CIM]

2K. Agentes Potenciales de Bioterrorismo [Solo Estándares de Interpretación para CIM]

La tabla 2A es exclusivamente para *Enterobacteriaceae* y detalla:

- Condiciones de prueba
- Recomendaciones mínimas de control de calidad
- Comentarios generales

Títulos en M100 tabla 2A

Grupo Prueba/Reporte	Agente Antimicrobiano	Concentración del antibiótico en el Disco	Diámetro de la zona de inhibición en mm			Equiv. Límites CIM (µg/mL)		Comentarios
			R	I	S	R	S	

Los diámetros de zona y sus equivalentes en límites de CIM para cada agente antimicrobiano se detallan junto con información adicional. Tome en cuenta que los criterios de interpretación varían de acuerdo con el agente antimicrobiano.

Criterios de Interpretación (R, I, y S)

Los escatogramas (también conocidos como scatterplots) se usan para establecer los criterios de interpretación de CIM y difusión por disco, los cuales se conocen también como límites.

El siguiente escatograma representa los resultados de un agente antimicrobiano hipotético.

Los límites se establecen dando los siguientes pasos:

- Varios cientos de aislamientos son analizados con los métodos estándar de difusión por disco y CIM del NCCLS. La CIM y su correspondiente diámetro de zona son delineados para cada aislamiento. En este *scatterplot*, cada punto representa resultados de pruebas de uno o más aislamientos.
- Los puntos de corte CIM son establecidos luego del análisis de:
 - La distribución de las CIMs
 - Las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del agente antimicrobiano (básicamente, como se distribuye y funciona el agente antimicrobiano en el paciente)
 - Correlacionando datos clínicos de resultados individuales de CIM con la respuesta de los pacientes.
- Luego se establecen los puntos de corte de la **Difusión por Disco**:
 - Examinando el escatograma para determinar las mediciones de zona que mejor se correlacionan con los límites de CIM para resistente, intermedio y susceptible.
 - Se cuenta el número de puntos fuera del campo (puntos rojos) para calcular el porcentaje de aislamientos que presentan discrepancias entre la interpretación de difusión por disco y CIM. Para que los criterios de interpretación sean aceptables, el porcentaje de errores no puede exceder los límites preestablecidos por la FDA y el NCCLS.

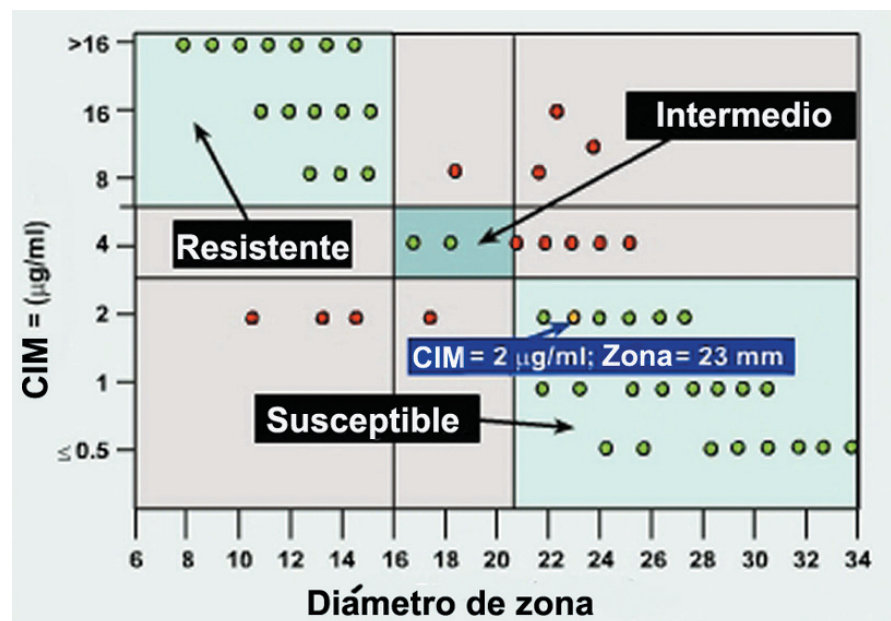


Figura 3.3—Escatograma

Errores de Interpretación

Los errores de interpretación con nuestra prueba hipotética de difusión por disco se categorizan de la siguiente manera:

Categoría de Error	CIM	Difusión por Disco
Muy Importante (falso susceptible)	R	S
Importante (falso resistente)	S	R
Insignificante	S o R	I
Insignificante	I	S o R

Los siguientes criterios de interpretación fueron derivados para el agente antimicrobiano "X":

Método	Susceptible	Intermedio	Resistente
Difusión de Disco (mm)	≥ 21	17–20	≤ 16
CIM ($\mu\text{g/mL}$)	≤ 2	4	≥ 8

Tablas 2I & 2J

La tabla 2I provee información sobre *Vibrio cholerae*, el cual se aísla con poca frecuencia en los Estados Unidos. Este cuadro es útil para los microbiólogos de otros países donde el *V. cholerae* es más común.

La tabla 2J aborda al *Helicobacter pylori*, el cual solo puede ser analizado confiablemente por el método de CIM.

Tabla 2K

La tabla 2K provee los estándares de interpretación CIM para agentes potenciales de bioterrorismo: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia mallei*, y *Burkholderia pseudomallei*.

Otras bacterias

El NCCLS no tiene recomendaciones para todas las especies que podrían merecer pruebas de susceptibilidad en el laboratorio clínico. No es apropiado utilizar recomendaciones específicas para un grupo de organismos para analizar una especie que no pertenezca a ese grupo.

Tablas 3 & 3A

La tabla 3 contiene límites aceptables de control de calidad para bacterias no fastidiosas. La tabla 3A es muy similar a la tabla 3, pero aborda a las bacterias fastidiosas. Los límites de control de calidad para cepas patrón de control de calidad ATCC están enumerados para cada agente antimicrobiano. Realizar pruebas con estas cepas de la misma manera que se hace con los aislamientos de pacientes permite verificar que el sistema está funcionando adecuadamente. Si los resultados de la cepa patrón de control de calidad se encuentran dentro de los límites establecidos en las tablas 3 y 3A, el lector puede estar seguro de que el sistema de análisis está funcionando

adecuadamente. La frecuencia y los detalles sobre las pruebas de cepas patrón de control de calidad se pueden encontrar en la sección de control de calidad del documento M100.

EJERCICIO NCCLS

A continuación hay un ejercicio para ayudar al lector a usar los estándares NCCLS y las tablas complementarias. Para realizar el ejercicio, usted debe tener a mano la versión más actualizada del documento M100.

Este ejercicio fue desarrollado por personas que tienen experiencia realizando pruebas de susceptibilidad antimicrobiana utilizando el método de difusión por disco. En otros capítulos discutiremos detalles sobre la realización de ambas pruebas: la difusión por disco y la CIM.

Suponga que usted es el supervisor del laboratorio de microbiología de un hospital comunitario y sus clínicas de consulta externa. El comité de Farmacia y Terapéutica (F&T) le ha pedido que desarrolle un panel de agentes antimicrobianos para ser usado específicamente en el análisis de aislamientos de bacterias gram negativas en orina. El comité F&T está compuesto por miembros que representan a los servicios médicos, quirúrgicos y de farmacia y que cuenta además con aportes de los servicios de enfermedades infecciosas, laboratorio y posiblemente otros.

Elabore un panel de 8–10 agentes antimicrobianos que sean apropiados para aislamientos de *Enterobacteriaceae* en orina mediante la prueba de difusión por disco.

Recuerde, es importante probar los agentes antimicrobianos que se usan en su institución. A esta lista se la conoce como el vademécum de la farmacia y puede ser suministrado por su servicio de farmacia. Los agentes incluidos en el vademécum son seleccionados por el comité de F&T.

Cómo escoger el panel

Ahora tiene tres listas de apoyo:

El Vademécum de su Institución (ver abajo)

El Cuadro 1 del documento M100 NCCLS

El Glosario del documento M100 NCCLS

Vademécum de la Farmacia

Aminoglucósidos

gentamicina, tobramicina

Beta-lactámicos

amoxicilina/ ácido clavulánico, ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, cefalexina, cefalotina, imipenem, oxacilina, penicilina, piperacilina, piperacilina /tazobactame

Fluoroquinolonas

Ciprofloxacina

Macrólidos

claritromicina, eritromicina

Tetraciclinas

doxiciclina, tetraciclina

Otro

cloramfenicol, clindamicina, metronidazol, nitrofurantoina, trimethoprim/sulfamethoxazole, vancomicina

Como abreviar la lista

En la tabla 1 del M100, ubique la columna de *Enterobacteriaceae*. Los agentes se dividen en Grupos A, B, C, o U y se subdividen en pequeñas casillas.

Grupo A

El colocar a los antimicrobianos en grupos y casillas lo guiará en el proceso de selección de ellos. Para mayor información consulte la “Introducción a las tablas” en el M100 NCCLS.

El Grupo A incluye agentes primarios que son probados y reportados rutinariamente para *Enterobacteriaceae*. Se puede observar tres casillas, una de ellas contiene tanto cefazolina como cefalotina porque ambos tienen un espectro de actividad comparable. Usualmente usted solo necesita probar un medicamento por casilla, típicamente el que está en el vademécum de su institución.

¿Cuál de estos incluiría en su panel?

- A. Ampicilina, Cefazolina, Gentamicina
- B. Ampicilina, Cefalotina, Gentamicina

(La opción B es correcta. Estos agentes están en el Grupo A y en el vademécum.)

Grupo B

El Grupo B ofrece opciones adicionales de antimicrobianos para probar y reportar selectivamente si es necesario. Algunos laboratorios siguen un protocolo selectivo de reportes y reportan los resultados de los agentes secundarios (Grupo B) analizados sólo si el aislamiento es resistente a los agentes primarios (Grupo A) de la misma familia de antimicrobianos.

¿Qué significa “o” en algunos recuadros de la tabla 1?

Bajo *Enterobacteriaceae* en el Grupo B, observe la casilla que contiene cefotaxima, ceftizoxima y ceftriaxone. Los tres antimicrobianos, listados alfabéticamente, están conectados por un “o” porque la resistencia cruzada y los perfiles de susceptibilidad son casi idénticos. Por lo tanto, los resultados (susceptible, intermedio, o resistente) de uno pueden ser usados para predecir los resultados de los otros dos.

Esta lista es diferente de la casilla con cefalotina y cefazolina del Grupo A que no contiene un “o.” Por ende, si la casilla no tiene un “o” no podemos deducir los resultados y debemos probar cada medicamento por separado, si es necesario.

Escoja del Grupo B los agentes apropiados para el tratamiento de infecciones de vías urinarias (IVUs) y prepare un panel que sea útil para los médicos en el tratamiento de pacientes ambulatorios así como hospitalizados. En caso necesario, aquí están las instrucciones de cómo empezar.

1. Use el Glosario NCCLS (en M100) para ver que agentes pertenecen a cada uno de los cuatro grupos planteados en la pregunta.
2. Determine cuáles de estos agentes están en el vademécum.
3. Determine cuáles de estos agentes son apropiados para analizar y reportar aislamientos de *Enterobacteriaceae* en orina.

¿Tomando como base la información contenida en la tabla 1 Grupo B del documento M100 de NCCLS, qué agente antimicrobiano específico escogería de cada uno de los cuatro grupos presentados a continuación?

- A. Una cefalosporina de amplio espectro o una cefalosporina de tercera generación (cefem parenteral)
- B. Una penicilina de amplio espectro o una ureidopenicilina.
- C. Una combinación de un beta-lactámico con un inhibidor de beta-lactamasa (administrado oralmente)
- D. Una fluoroquinolona

(Respuestas: A. cefotaxima; B. piperacilina; C. amoxicilina-ácido clavulánico; D. Ciprofloxacina)

Como Completar la Lista

Los agentes del Grupo C usualmente son probados solo en circunstancias especiales, entonces nos abstendremos de añadir cualquiera de éstos a nuestro panel.

Los agentes del Grupo U son usados solo para tratar infecciones de vías urinarias bajas y no deben ser reportados en aislamientos de otras partes del cuerpo.

¿Cuál de los agentes del Grupo U añadiría usted?

- A. Gatifloxacina
- B. Nitrofurantoina
- C. Trimetoprima

(Respuesta: B. La nitrofurantoina está en el vademécum del hospital y es el antimicorbiano apropiado para reportes en aislamientos urinarios.)

Los agentes del Grupo U deben ser probados solo si son apropiados para su institución o para los pacientes.

El Panel

Este es el panel escogido por los autores:

Amoxicilina- ácido clavulánico
Ampicilina
Cefotaxima
Cefalotina
Ciprofloxacina
Gentamicina
Nitrofurantoina
Piperacilina
Trimetoprima-sulfamethoxazole

Después de revisar el panel, el comité F&T sugiere una reunión para discutir la lista. Ahora ellos tienen algunas preguntas para usted:

Pregunta del Médico # 1

Un médico que está tratando un paciente con una infección de vías urinarias por *Citrobacter freundii* pide resultados para levofloxacina. ¿Qué haría usted? Vea la siguiente información:

Revise la Tabla 1, Grupo B del M100 y los agentes agrupados dentro de las casillas. Debido a que la levofloxacina está en la misma casilla que la ciprofloxacina y

vinculada por un “o” podemos extrapolar el resultado de levofloxacina al obtenido con ciprofloxacina porque la susceptibilidad y resistencia cruzadas entre estos dos antimicrobianos es casi idéntica.

¿Entonces cómo reportaría los resultados? Vea más abajo ejemplo de reporte

Siempre reporte el resultado del antimicrobiano que en realidad probó y añada un comentario con relación a la comparación con otros antimicrobianos. Cualquier excepción a esta regla se abordará en el capítulo relacionado con el grupo específico del organismo.

Reporte de Laboratorio

Fuente del Espécimen: Orina

Resultados: *Citrobacter freundii*

Amoxicilina-ácido clavulánico	R
Ampicilina	R
Cefotaxima	R
Cefalotina	R
Ciprofloxacina	S
Gentamicina	S
Nitrofurantoina	S
Piperacilina	R
Trimethoprima-sulfamethoxazole	R

Comentario: Los *Citrobacter freundii* que son susceptibles a ciprofloxacina lo son también a levofloxacina

Pregunta del Médico # 2

¿Cómo respondería al médico si le pide que el panel incluya principalmente agentes que son administrados por vía oral? La mayoría de las infecciones de vías urinarias agudas no complicadas ocurren en pacientes ambulatorios; por consiguiente es deseable utilizar agentes administrados por vía oral.

¿Qué recurso del documento M100 le ayudaría a contestar la pregunta?

- A. El Cuadro 1NCCLS
- B. El Glosario I NCCLS
- C. El Glosario II NCCLS

Respuesta:

C. El Glosario II le permite determinar la vía de administración de los antimicrobianos: (PO *per os* (por la boca) vía oral; IM, intramuscular; IV, intravenosa)

¿Tomando como referencia el Glosario II, cómo se administraría la ampicilina? Seleccione todas las que apliquen.

- A. PO (oral)
- B. IM (intramuscular)
- C. IV (intravenosa)

Respuesta:

A, B y C. La ampicilina existe en las tres formas de presentación, entonces el médico puede elegir la vía y la dosis en base al tipo de infección.

Ahora revise la nitrofurantoina; ¿Cómo es administrada?

- A. PO (oral)
- B. IM (intramuscular)
- C. IV (intravenosa)

Respuesta:

A. La nitrofurantoina sólo puede ser administrada por vía oral.

Observando la lista de antimicrobianos seleccionados anteriormente, puede ver que cinco de los nueve tienen una vía de administración oral.

Pregunta del Médico # 3

El médico ahora quiere saber si el panel puede incluir una cefalosporina de administración oral.

La cefalotina es una cefalosporina de reducido espectro o de primera generación, pero sólo está disponible en forma intravenosa (IV). La cefalexina sí tiene una presentación oral (PO). Los resultados de la cefalotina pueden utilizarse para predecir los resultados de cefalosporinas orales como la cefalexina. (Ver tabla 1 M100, nota de pie de página a.)

¿Por qué algunos antimicrobianos están listados en la tabla 2A pero no en la tabla 1? Seleccione todas las que apliquen.

Para mayor información consulte la “Introducción a las tablas” en el documento M100 de NCCLS.

- A. Esto es probablemente un error.
- B. Algunos antimicrobianos podrían tener una indicación para el grupo de organismos pero generalmente no son apropiados para pruebas y reportes de rutina en los Estados Unidos.
- C. Algunos antimicrobianos se encuentran en investigación y aún no han sido aprobados por la FDA.

Respuesta:

B y C. Estos antimicrobianos están listados en la tabla 2A como grupo de prueba/reporte “O” que significa “Otro” o “Inv” que significa “En Investigación.”

Medicamentos Seleccionados para la tabla 1

Los criterios que guían la inclusión de un antimicrobiano en la tabla 1 incluyen:

- Eficacia clínica comprobada
- Consenso sobre las recomendaciones para su uso
- Actividad *in vitro* aceptable
- Prevalencia de resistencia (utilidad del antimicrobiano en el contexto de la resistencia a otros agentes)
- Reducción en la aparición de cepas resistentes
- Costo

Pregunta del Médico # 4

¿Cómo describiría a un médico sus criterios de reporte selectivo para los antimicrobianos incluidos en este panel? Por favor vea el panel seleccionado por los autores que se presentó anteriormente.

Recuerde que el Grupo B enumera agentes que podrían ser reportados selectivamente si el organismo es resistente a los agentes de la misma familia que constan en el Grupo A.

Si se aplica este algoritmo, reportaríamos:

Amoxicilina-ácido clavulánico—sólo si el aislamiento es resistente a ampicilina

Cefotaxima—sólo si el aislamiento es resistente a cefalotina

El comité está de acuerdo en que el reporte selectivo puede estimular a los clínicos a usar agentes de espectro reducido. Por supuesto que podría haber circunstancias clínicas en que esto no sea apropiado.

Mire el siguiente reporte del laboratorio A:

Fuente del espécimen: Orina

Resultados: *E. coli*

Amoxicilina-ácido clavulánico	S
Ampicilina	S
Cefotaxima	S
Cefalotina	S
Ciprofloxacina	S
Gentamicina	S
Nitrofurantoina	S
Piperacilina	S
Trimetoprima-sulfamethoxazole	S

¿Tomando como base el algoritmo de reporte selectivo que decidimos utilizar, son estos agentes antimicrobianos correctos?

- A. Sí
- B. No

Respuesta:

B (No). No se debe reportar amoxicilina/ácido clavulánico ni cefotaxima porque la *E. coli* es susceptible a ampicilina y cefalotina.

Mire el siguiente Reporte del Laboratorio B:

Fuente del Espécimen: Orina

Resultados: *E. coli*

Amoxicilina-ácido clavulánico	S
Ampicilina	R
Cefotaxima	S
Cefalotina	R
Ciprofloxacina	S
Gentamicina	S
Nitrofurantoina	S
Piperacilina	S
Trimetoprima-sulfamethoxazole	R

¿Tomando como base el algoritmo de reporte selectivo que decidimos utilizar, son estos agentes antimicrobianos correctos?

- A. Sí
- B. No

Respuesta:

A (Sí). Esta *E. coli* es resistente a los agentes primarios ampicilina y cefalotina y por lo tanto los agentes secundarios amoxicilina/ácido clavulánico y cefotaxima deben reportarse.

Resumen de como la lista de antimicrobianos fue seleccionada para la inclusión en su panel:

1. Se revisó la tabla 1 de NCCLS para escoger los antimicrobianos apropiados para aislamientos de *Enterobacteriaceae* en orina.
2. Se revisó los agentes incluidos en el vademécum de la institución.
3. Se usó el Glosario NCCLS para seleccionar los antimicrobianos que pueden ser administrados por vía oral.
4. Se trabajó con el comité F&T para desarrollar una estrategia de reporte selectivo del panel de antimicrobianos seleccionados.

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

1. ¿Qué es el NCCLS?
 - A. Una agencia de gobierno que acredita laboratorios.
 - B. Un comité de profesores universitarios que escribe documentos para la práctica de laboratorio.
 - C. Una organización que promueve el desarrollo y uso voluntario de estándares y guías de laboratorio.
2. El principal documento que debe ser utilizado como una guía para realizar pruebas de susceptibilidad de difusión por disco es:
 - A. El Registro Federal
 - B. El protocolo NCCLS para pruebas por disco
 - C. El libro de texto de Bailey y Scott
 - D. El Manual ASM de Microbiología Clínica
 - E. La publicación Cumitech 6
3. ¿Debería usted seguir al pie de la letra las instrucciones contenidas en el documento M2 o M7 si usa un sistema comercial para pruebas de susceptibilidad?
 - A. Sí
 - B. No
4. ¿Cuál de los siguientes antimicrobianos tiene criterios de interpretación separados para difusión por disco y CIM dependiendo de si el antimicrobiano se administra por vía oral o parenteral?
 - A. cefaclor
 - B. ceftazidima
 - C. cefuroxima
 - D. cefazolina
 - E. ceftazidima

5. Para *E. coli* con diámetro de zona de resistencia de 13 mm o menos para ampicilina. ¿Cuál sería el límite equivalente de CIM (en µg/mL) para resistencia? Use M100 Tabla 2A para responder a esta pregunta.
- A. ≤8
B. 32
C. ≥32
6. Probando la *E. coli* ATCC 25922, obtuvimos las siguientes lecturas de diámetro de zona:

Medicamento	Zona (mm)
Amoxicilina/ácido clavulánico	22
Ampicilina	13
Cefazolina	25

¿Utilizando la tabla apropiada de control de calidad en el M100 (tabla 3) sería aceptable reportar los tres agentes en *Enterobacteriaceae* de sus pacientes?

- A. Sí
B. No
7. Un médico le pide que analice una *E. coli* contra penicilina porque el paciente ha estado recibiendo penicilina para una infección de garganta. ¿Realizaría la prueba?
- A. Sí
B. No
8. Un antibiograma puede ser definido mejor como:
- A. El patrón de susceptibilidad de una bacteria a aminoglucósidos y penicilina
B. Una tinción Gram de una bacteria expuesta a antimicrobianos
C. La susceptibilidad global de una bacteria
D. La susceptibilidad antimicrobiana y las características bioquímicas de una bacteria
E. Los antimicrobianos a los cuales una bacteria es resistente
9. (V o F) Cuando el laboratorio está determinando qué agentes antimicrobianos probar y reportar rutinariamente, debe obtener ayuda del servicio de enfermedades infecciosas, farmacia y control de infecciones.
10. (V o F) Si la guía de NCCLS no tiene interpretaciones para resultados de susceptibilidad, es apropiado usar recomendaciones específicas de un grupo de organismos para analizar una especie que no forma parte de ese grupo.
11. (V o F) Para algunas combinaciones de antimicrobiano/organismo, tales como cefotaxima y *Streptococcus pneumoniae*, sólo la prueba de CIM es apropiada porque la difusión por disco no es confiable para esta combinación.

4

Prueba de Difusión por Disco

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Enumerar los pasos requeridos para realizar una prueba de difusión por disco.
- Mencionar las variables que deben ser controladas cuando se realiza la prueba.
- Reconocer los problemas que podrían ocurrir si las variables de la prueba no son controladas apropiadamente.
- Discutir los dos métodos básicos de preparación del inóculo y la aplicación de cada uno de ellos.
- Basado en las las recomendaciones de NCCLS, interpretar los diámetros de la zona de inhibición como sensible, intermedio o resistente para organismo/agente antimicrobiano específicos.

ANTECEDENTES

El principio de las pruebas de difusión por disco ha sido utilizado por más de 70 años en los laboratorios de microbiología. Alexander Fleming utilizó una variante de esta técnica cuando trabajaba con la penicilina en los años cincuenta. En ese tiempo, había tantos procedimientos diferentes en uso como microbiólogos.

Los doctores Bauer, Kirby, Sherris y Turck probaron minuciosamente todas las variables involucradas en el proceso, tales como los medios de cultivo, la temperatura y el espesor del agar. En 1966, ellos publicaron su estudio cimero describiendo la prueba que se usa en la actualidad.

El NCCLS adoptó los pasos básicos del procedimiento descritos en el estudio de Bauer como el método de referencia para difusión por disco. Estos pasos deben seguirse en **forma minuciosa** para obtener resultados precisos.

CÓMO REALIZAR LA PRUEBA – REVISIÓN

Una vez que se han aislado colonias de un organismo que ha sido identificado como patógeno potencial, es necesario proceder de la siguiente manera para realizar la prueba de susceptibilidad.

1. Seleccionar las colonias
2. Preparar una suspensión del inóculo
3. Estandarizar la suspensión del inóculo
4. Inocular la placa



Figura 4.1—Seleccionando colonias bien aisladas para el inóculo

5. Colocar discos de antimicrobiano
6. Incubar la placa
7. Medir las zonas de inhibición
8. Interpretar los resultados

Seleccionar las Colonias

Uno de los pasos más importantes en el proceso de la prueba es la preparación del inóculo. Esto involucra la selección de colonias apropiadas para la prueba, su suspensión en caldo y la estandarización de la suspensión.

Primero, seleccione varias colonias del organismo que esté analizando. Si selecciona entre 3–5 colonias, en vez de solo una, sus chances de detectar resistencia son mayores.

Nota: Utilizando una herramienta de inoculación (o un hisopo de algodón) recoja de la placa sólo colonias bien aisladas para evitar pruebas de cultivo mixto. Si no dispone de colonias bien aisladas, haga un subcultivo del organismo en una nueva placa.

Cómo Preparar y Estandarizar la Suspensión del Inóculo

Existen dos métodos para la preparación de inóculo: *suspensión directa de colonias* y *fase logarítmica de crecimiento*. Sólo el método de suspensión directa de colonias proveerá resultados precisos para ciertos organismos. En ambos métodos, la turbidez de la suspensión debe ser estandarizada (para que sea igual) al estándar 0,5 de McFarland (lo que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Las suspensiones así ajustadas deben utilizarse como inóculo dentro de los 15 minutos siguientes.

Nota: Los estándares de McFarland están hechos ya sea de sulfato de bario o partículas de látex. Si usa sulfato de bario, agite antes de usar, si usa látex, invierta para mezclar. Una fórmula para el estándar 0,5 de McFarland se encuentra en el Apéndice.

Suspensión Directa de Colonias

Para el método de suspensión directa de colonias, las colonias no deben sobrepasar las 18–24 horas de aislamiento. Estandarice el inóculo al mismo tiempo que prepara



Figura 4.2—Estandarización del Inóculo

la suspensión. Suspenda las colonias en solución salina o caldo (eje. Mueller-Hinton o soya tríptica). Luego, ajuste el inóculo a una turbidez equivalente al estándar 0,5 de McFarland. Puede comparar la turbidez de las suspensiones poniendo los tubos frente a un papel blanco o una tarjeta de archivo con líneas negras.

Use suspensión directa de colonias para los siguientes organismos:

- Todos los estafilococos
- Bacterias fastidiosas que tienen crecimiento impredecible en caldo: eje., estreptococos

Método de Fase Logarítmica

El método de fase logarítmica se usa con la mayoría de organismos que crecen rápidamente excepto estafilococos. Una vez que se han inoculado las colonias en un caldo, incuba a 35 °C para lograr un crecimiento en fase logarítmica. Una curva de crecimiento para una bacteria típica se muestra a continuación. El crecimiento de fase logarítmica ocurre después de 2–8 horas de incubación.

Después de la incubación, ajuste la turbidez para que sea igual al estándar 0,5 de McFarland. Asegúrese de conocer como ajustar y estandarizar el inóculo.

- ¿Qué haría si la suspensión de organismos es demasiado turbia?
- ¿Qué haría si la suspensión es demasiado clara para la suspensión directa de colonias?

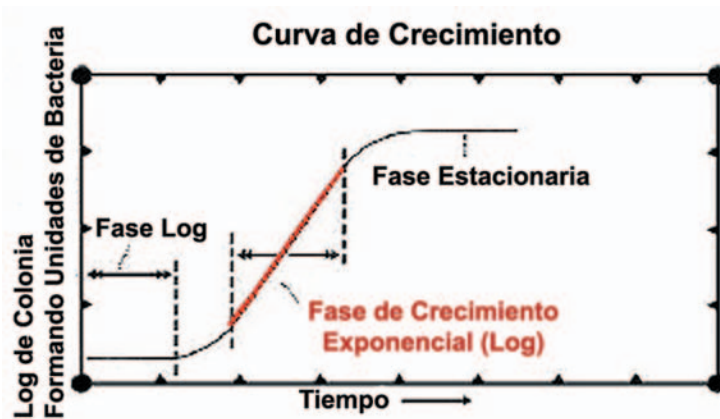


Figura 4.3—Plot de un crecimiento de fase log



Figura 4.4—Removiendo el exceso de líquido del hisopo

- C. ¿Qué haría si la suspensión es demasiado clara para el método de fase logarítmica?

Respuestas correctas:

- A. Añada más caldo o solución salina para igualar la turbidez a 0,5 del estándar de McFarland.
- B. Tome más colonias y suspéndalas en el caldo.
- C. Re-incube la suspensión.

Nota: No use cultivos en medio líquido de la noche anterior ni tampoco inóculos no estandarizados para inocular las placas.

Cómo Prepararse para la Inoculación de la Placa

Retire el contenedor de discos del congelador o refrigerador. *Antes de abrir el contenedor*, permita que los discos se equilibren a la temperatura ambiente durante una a dos horas para minimizar la condensación y reducir la posibilidad de que la humedad afecte la concentración de los agentes antimicrobianos.

Permita que la placa de Agar Mueller-Hinton (MHA) se caliente a la temperatura ambiente para que cualquier exceso de humedad se absorba dentro del medio. Este proceso se puede acelerar poniendo las placas entreabiertas en el incubador por 10–15 minutos. Asegúrese que la placa de MHA tenga la profundidad adecuada de 4 mm.

Agite la suspensión del organismo para asegurarse que está bien mezclada. Luego, sumerja un hisopo de algodón estéril en la suspensión. Remueva el exceso de líquido del hisopo presionándolo contra la pared del tubo.

Cómo Inocular la Placa

Empezando en la parte superior de la placa MHA inocule la superficie con el hisopo. Cubra toda la placa frotando de ida y vuelta de un borde al otro. Rote la placa



Figura 4.5—Inoculación de la placa

aproximadamente 60° y repita el procedimiento de frotado. Rote otra vez la placa 60° y frote toda la placa por tercera vez. Esto garantizará que el inóculo sea distribuido homogéneamente.

Sugerencia técnica: Incube la placa dentro de los 15 minutos siguientes después de haber estandarizado el inóculo.

Cómo Aplicar los Discos de Antimicrobianos

Coloque los discos con los agentes antimicrobianos dentro de los 15 minutos siguientes a la inoculación de la placa MHA. Los discos pueden ser colocados uno a uno o con un dispensador de discos multi-canal como se observa en la Figura 4.6.

Típicamente, se pueden aplicar hasta 12 discos en una placa de 150 mm de diámetro o hasta 5 discos en una placa de 100 mm. Presione cada disco firmemente para asegurar el contacto completo con la superficie de agar. No se olvide de este paso o los discos pueden terminar en la tapa de la placa después de la incubación.

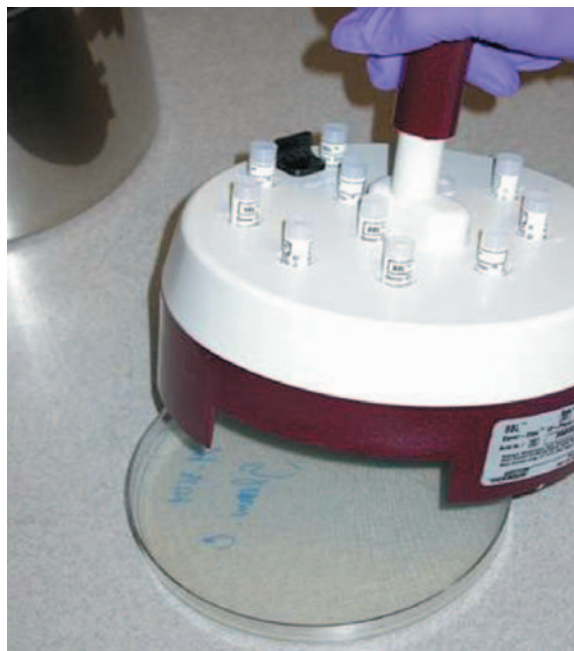


Figura 4.6—Aplicando discos con un dispensador

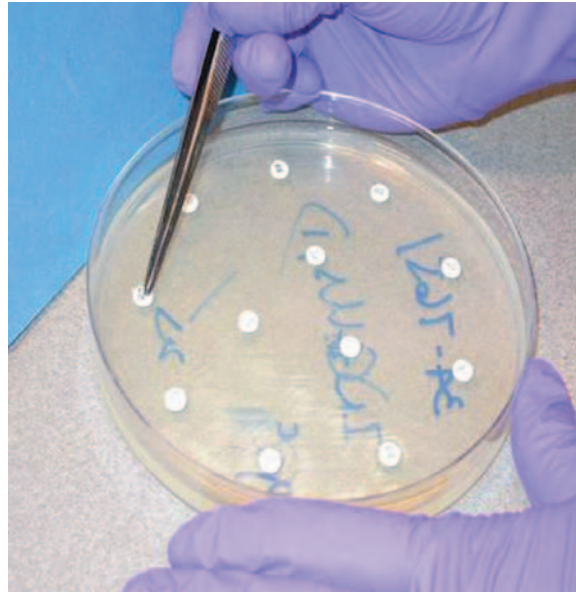


Figura 4.7—Presionando los discos para asegurar contacto

Puntos que hay que recordar sobre los discos de antimicrobianos:

- No use discos después de su fecha de caducidad.
- No almacene discos en un congelador libre de escarcha.
- Use productos aprobados por la FDA.
- Use discos con el contenido especificado en los estándares de NCCLS.
- No reubique un disco una vez que éste ha tocado la superficie del agar.

Cómo Incubar la Placa

- Invierta las placas e incúbelas .
- Para las bacterias no fastidiosas, incube (en aire ambiente) a 35°C por 16–18 horas.
- Para la prueba de difusión por disco de bacterias fastidiosas, use las condiciones de incubación recomendadas por el NCCLS, como se muestra en el siguiente cuadro.

Bacteria	Medio	Incubación	
		Tiempo (h)	Atmósfera
<i>Haemophilus</i> spp.	Medio de Prueba para <i>Haemophilus</i>	16–18	CO ₂ (5%)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Agar base GC + 1% sup.	20–24	CO ₂ (5%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MHA-5% sangre de cordero	20–24	CO ₂ (5%)
Otros <i>Streptococcus</i> spp.	MHA-5% sangre de cordero	20–24	CO ₂ (5%)

Cómo Medir las Zonas de Inhibición – Luz Reflejada

Después de retirar la placa de la incubadora:

- Examine detenidamente la placa para verificar que el crecimiento sea uniforme y confluyente de tal modo que pueda identificar zonas sin crecimiento bacteriano.

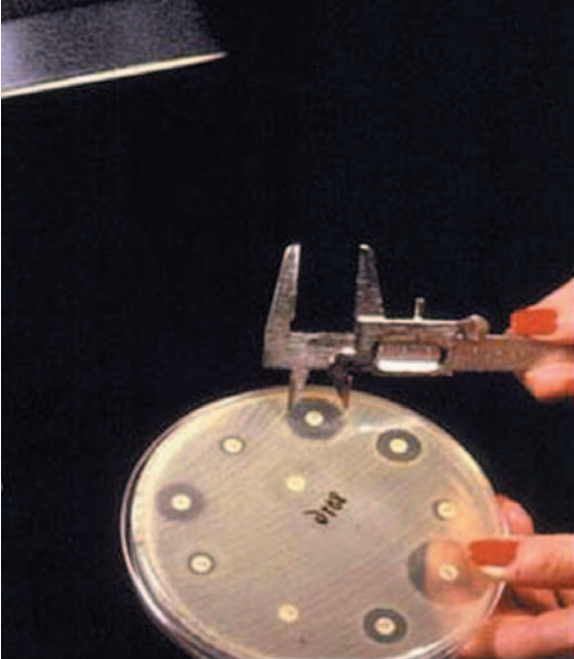


Figura 4.8—La luz reflejada es usada para medir las zonas desde la parte posterior de la placa

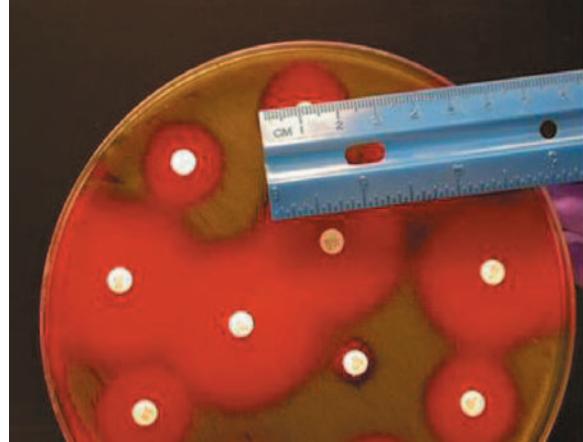


Figura 4.9—Midiendo zonas en una placa BA destapada

Para medir las zonas de inhibición desde la parte posterior de la placa usando luz reflejada:

- Sostenga la placa unos pocos centímetros sobre una superficie de color negro que no refleje la luz.
- Mida redondeando al milímetro más cercano con una regla o un calibrador.
- La luz reflejada es usada para *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, otros bacilos gram negativos, estafilococos y enterococos (excepto para oxacilina y vancomicina).
- La luz reflejada también es usada cuando se miden zonas de inhibición en agar Mueller-Hinton sangre

Sugerencia técnica: Cuando analice estreptococos en agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de cordero, retire la tapa y mida las zonas desde la parte superior de la placa.

Cómo Medir las Zonas de Inhibición – Luz Transmitida

Use luz transmitida, en vez de luz reflejada, cuando mida zonas de:

- Estafilococos con oxacilina
- Enterococos con vancomicina



Figura 4.10—Zona doble de Inhibición



Figura 4.11—Zona con colonias internas y anillo verde que indica zona a ser leída

CÓMO INTERPRETAR LOS RESULTADOS

Cómo Medir Zonas de inhibición Inusuales

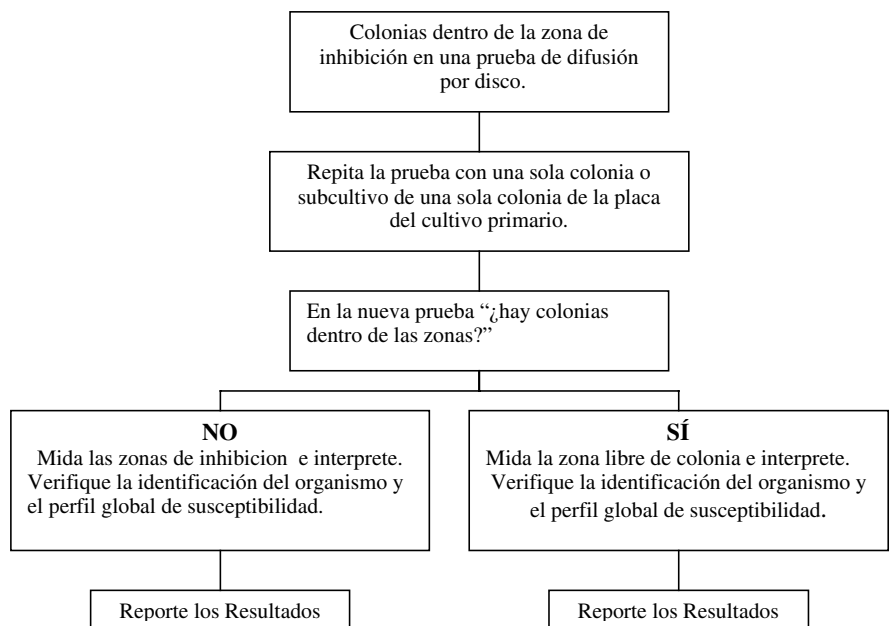
Algunas zonas podrían ser difíciles de medir. Las Figuras 4.10 4.11 y 4.12 presentan ejemplos de zonas inusuales.

Doble zona: Mida la zona más interna.

Colonias dentro de la zona: Esto puede deberse ya sea a un cultivo mixto, que por lo general es obvio, o a una subpoblación resistente de la bacteria analizada.

Cómo Interpretar Colonias dentro de las Zonas

A veces es difícil diferenciar un cultivo mixto de una subpoblación resistente.



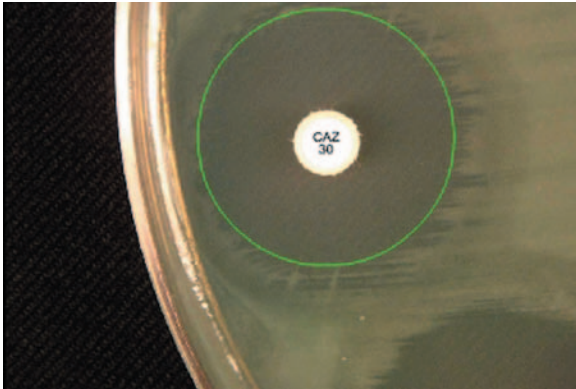


Figura 4.12—Zona afelpada alrededor del disco CAZ

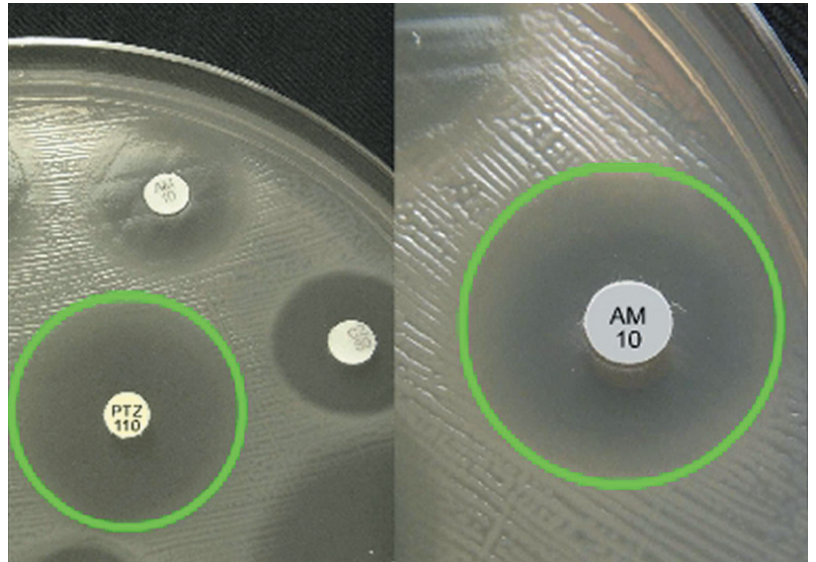


Figura 4.13—Zonas con brotes *Proteus mirabilis*

Cómo Interpretar la Zona de Inhibición con Bordes Difusos

Mida el punto en el cual se puede ver una demarcación obvia entre crecimiento y ausencia de crecimiento. Evite esforzarse para ver las colonias más diminutas.

Brotes debidos a *Proteus mirabilis*

Mida la zona que es obvia. Ignore el brote aún si este cubre la zona de inhibición.

Trimetoprima-Sulfamethoxazole (SXT)

Las zonas con trimetoprima-sulfamethoxazole (y también sulfonamidas, y trimetoprima solo) podrían ser difíciles de leer porque este agente podría no inhibir el crecimiento de las bacterias hasta que las bacterias hayan pasado por varias generaciones de crecimiento. Se podría observar un ligero crecimiento opaco dentro de la zona. Mida la zona en el punto en que haya una reducción del 80% en el crecimiento.

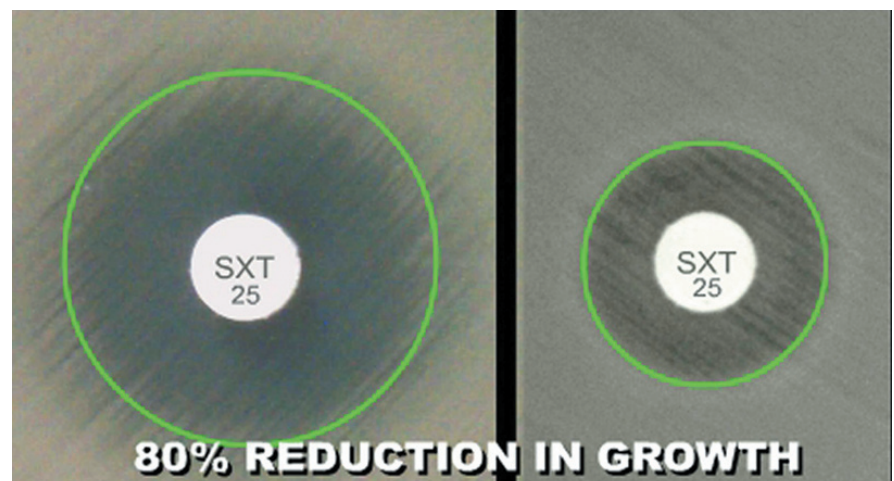


Figura 4.14—Dos cepas con zonas SXT



Figura 4.15—Resistencia heterogénea a oxacilina



Figura 4.16—Resistencia homogénea a oxacilina

Cómo Interpretar la Resistencia Heterogénea y Homogénea

Resistencia Heterogénea en *S. aureus*

A pesar de que ignoramos el crecimiento opaco que con frecuencia se observa alrededor de los discos dentro de las zonas de inhibición con brotes de *Proteus* spp. y alrededor de los discos de trimetoprima-sulfamethoxazole, la opacidad alrededor de un disco de oxacilina en una prueba de *S. aureus* es significativa y no debe ignorarse.

Resistencia Homogénea en *S. aureus*

El *S. aureus* con resistencia homogénea exhibe un crecimiento confluyente hasta el disco. Consulte el capítulo sobre Estafilococos para mayor información.

Cómo Controlar las Variables de la Prueba

Revise las variables enumeradas a continuación, las que deben ser controladas al realizar las pruebas de difusión por disco.

- Composición del medio de cultivo
- pH del medio
- Profundidad del agar
- Concentración del inóculo
- Procedimiento de inoculación
- Contenido del antimicrobiano en el disco
- Almacenamiento de los discos
- Número de discos en la placa
- Temperatura de incubación
- Atmósfera de incubación
- Tiempo de incubación
- Medición de la zona de inhibición

El capítulo 6 de este manual describe las prácticas de control de calidad que dan confianza de que todas las variables son controladas adecuadamente. Además, consulte la guía para resolver problemas que está en el Apéndice B.

CASO DE ESTUDIO

En un paciente se aisló por tercera ocasión *Pseudomonas aeruginosa* de una aspiración traqueal. Los dos primeros aislamientos fueron susceptibles a gentamicina y tobramicina; sin embargo, el tercer aislamiento fue resistente a ambos agentes. Como se presenta a continuación, los resultados de otros cuatro antimicrobianos fueron los mismos en esos tres días.

Medicamento	Cultivo en 2/11	Cultivo en 5/11	Cultivo en 9/11
Amikacina	S	S	S
Ceftazidima	S	S	S
Ciprofloxacina	S	S	S
Gentamicina	S	S	R
Piperacilina	S	S	S
Tobramicina	S	S	R

Comentario sobre el Caso de Estudio

¿Por qué los resultados del 9/11 podrían ser diferentes de aquellos obtenidos en los dos días previos? Más de una respuesta podría ser correcta.

- A. El aislamiento adquirió resistencia.
- B. El paciente adquirió una nueva cepa de *P. aeruginosa*.
- C. Hubo cambios o problemas en el sistema de prueba.

Respuesta: Las tres opciones son correctas.

- A. Siempre existe la posibilidad de que un aislamiento adquiera resistencia; sin embargo, ésta debe ser confirmada repitiendo la prueba.
- B. El paciente pudo haber adquirido una nueva cepa de *P. aeruginosa*, particularmente si el paciente estuvo en el hospital por un tiempo prolongado.
- C. Hubo cambios o problemas en el sistema de prueba. Sin embargo, las pruebas de control de calidad deben detectar problemas con un sistema de prueba.

Resultados de las pruebas de control de calidad con las cepas recomendadas *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 fueron los siguientes:

Fecha	# Lote MHA	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
2/11	A	OK	OK
5/11	A	OK	OK
9/11	B	OK	Amikacina 15 mm Gentamicina 14 mm Tobramicina 16 mm
10/11	B	OK	Amikacina 13 mm Gentamicina 14 mm Tobramicina 17 mm
10/11	C	OK	OK

Rangos Aceptables de Control de Calidad

<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
Amikacina	18–26 mm
Gentamicina	16–21 mm
Tobramicina	19–25 mm

Resultados de las pruebas de control de calidad con las cepas patrón de *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 recomendadas fueron los siguientes:

Acción correctiva:

9/11

Debido a un retraso en el despacho de MHA, el control de calidad en el lote B de MHA no se pudo realizar antes de analizar las muestras aisladas del paciente.

Puesto que los resultados de control de calidad estuvieron fuera del rango aceptable, todos los resultados de los aminoglucósidos probados en los aislamientos del paciente fueron verificados y los aislamientos fueron analizados otra vez con MHA del lote C.

10/11

El control de calidad fue aceptable en el lote C de MHA y los resultados de los aislamientos del paciente analizados con este medio fueron reportados. El lote B de MHA fue devuelto al fabricante.

Cuando se realizó nuevamente la prueba del aislamiento del paciente que se cultivó el 9/11 con el lote C de MHA, éste tuvo el mismo perfil que sus aislamientos previos.

¿Cuál es el problema más probable con el lote B de MHA?

- A. La profundidad del agar es demasiado superficial.
- B. El contenido de cationes es demasiado alto.
- C. El pH del medio es demasiado alto.

Respuesta:

- A. Es incorrecta porque solo los resultados de los aminoglucósidos estuvieron fuera del control.
- B. Es correcta. Considerando que solo los aminoglucósidos y la *P. aeruginosa* ATCC 27853 están fuera del control, esta es la explicación más probable. Una concentración inaceptablemente alta de los cationes divalentes, calcio y magnesio, puede causar una susceptibilidad reducida de la *P. aeruginosa* a los aminoglucósidos.
- C. Es incorrecta. Los aminoglucósidos podrían presentar menor actividad en un pH ácido o bajo, pero a un pH más alto esto no debe ocurrir.

REVISIÓN

Ahora el lector debe estar familiarizado/a con la prueba de difusión por disco para bacterias no fastidiosas y conocer un poco sobre la prueba para bacterias fastidiosas.

Recuerde:

- Usar los estándares de NCCLS más actualizados que proveen información para realizar la prueba de difusión por disco (el estándar M2) e interpretar y reportar los resultados (los cuadros M100).

- Seguir al pie de la letra los pasos recomendados.
- Familiarizarse con las excepciones del método estándar para analizar ciertas combinaciones de organismos/agentes antimicrobianos. Esto se abordará en capítulos subsiguientes incluyendo más información sobre pruebas para bacterias fastidiosas.

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

1. (V o F) Si selecciona 3–5 colonias, en vez de sólo una, al preparar la suspensión del inóculo, sus chances de detectar resistencia son mayores.
2. (V o F) Cualquier zona alrededor de discos de oxacilina, meticilina o nafcilina debe ser examinada utilizando luz transmitida; otras zonas deben ser examinadas utilizando luz reflejada.
3. (V o F) El método de estandarización de suspensión directa para la preparación del inóculo debe ser usado cuando se analicen estafilococos y las penicilinas resistentes a la penicilinasasa.
4. (V o F) Es aceptable almacenar soluciones antimicrobianas y discos en congeladores libres de escarcha.
5. Complete las frases.

Método de Suspensión Directa de Colonias

Seleccione colonias que tengan ___ horas de vida para evitar analizar células no viables. Estandarice la turbidez del inóculo para que sea equivalente a ___ del estándar de McFarland.

Método de Fase Logarítmica

Recoja colonias utilizando un hisopo o una aguja de inoculación, inocule el caldo, e incube a 35° C ___ horas para alcanzar el crecimiento de fase logarítmica. Estandarice la turbidez del inóculo para que sea equivalente a ___ del estándar de McFarland.

6. ¿Usaría la suspensión directa de colonias, el método de fase logarítmica o ambos para cada una de las siguientes posibilidades? Combine el método con las bacterias.

A. Método de fase logarítmica	Enterobacteriaceae	_____
B. Suspensión directa de colonias	Estafilococos	_____
C. Ambos métodos son aceptables	Bacterias Fastidiosas	_____
7. La prueba estándar de Kirby-Bauer de difusión por disco que utiliza agar Mueller-Hinton no complementado puede ser usada confiablemente para analizar
 - A. Todos los aislamientos clínicos.
 - B. Organismos aeróbicos no fastidiosos de crecimiento rápido.
 - C. Organismos aeróbicos y anaeróbicos de crecimiento rápido.
 - D. Sólo los entéricos y *Staphylococcus* spp.
 - E. Todos los aislamientos clínicos excepto aquellos que se consideran “flora normal”.
8. Si los discos de antimicrobianos no se colocan en una placa de agar Mueller-Hinton dentro de los 15 minutos siguientes a la inoculación, ¿Qué es lo más probable que ocurra?
 - A. Las zonas de inhibición podrían volverse demasiado grandes.
 - B. Las zonas de inhibición podrían volverse demasiado pequeñas.

- C. Algunas zonas de inhibición podrían volverse demasiado grandes y otras demasiado pequeñas.
 - D. No hay ningún efecto en las zonas de inhibición.
 - E. Podrían aparecer colonias dentro de las zonas de inhibición.
9. Está leyendo el tamaño de las zonas en una placa Mueller-Hinton. El estrato de crecimiento aparece aceptable, pero usted nota colonias dentro de la zona. ¿Qué podría causar este patrón de crecimiento? Más de una respuesta podría ser correcta.
- A. Las colonias dentro de la zona probablemente representan un cultivo mixto.
 - B. Las colonias representan una subpoblación de bacterias resistentes.
 - C. El inóculo es demasiado ligero.
10. Continuando con la pregunta 9, ¿Qué haría después?
- A. Ignorar las colonias dentro de la zona.
 - B. Considerar el aislamiento resistente.
 - C. Repetir la prueba utilizando colonias de las placas primarias o un subcultivo de éstas.

5

Pruebas de la Cim

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Enumerar los pasos necesarios para realizar la prueba de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por microdilución en caldo.
- Mencionar las variables que deben ser controladas cuando se realiza la prueba.
- Identificar los problemas que podrían ocurrir si las variables de la prueba no son controladas adecuadamente.
- Determinar el número de organismos viables en el inóculo para asegurar que el número correcto de organismos sea inoculado en cada fuente.
- Interpretar con base en las recomendaciones del NCCLS resultados de la CIM de un organismo/agente antimicrobiano específico como susceptible, intermedio o resistente.

ALCANCE

Este capítulo repasa la prueba de referencia de microdilución en caldo de la CIM según se describe en el documento M7 del NCCLS. Otros métodos de la CIM no son discutidos en detalle pero pueden encontrarse en el documento M7 del NCCLS. Los sistemas comerciales para determinar la CIM no están contemplados en este manual.

ANTECEDENTES DE LA PRUEBA

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de un agente antimicrobiano es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. Determinamos la concentración en el laboratorio incubando una cantidad conocida de bacterias con diluciones definidas del agente antimicrobiano. Utilizando los criterios de interpretación del NCCLS los resultados son interpretados como susceptible, intermedio o resistente.

Las pruebas de la CIM pueden ser realizadas usando como medios de cultivo en caldo o agar, pero la microdilución en caldo es el método más utilizado en los laboratorios clínicos.

Varias compañías fabrican paneles de CIM que contienen diluciones de uno o múltiples agentes antimicrobianos en un formato de microdilución en caldo. En los Estados Unidos, previo al uso de un producto comercial para aislamientos clínicos, este debe ser aprobado por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos)

Cada prueba comercial tiene procedimientos con pasos únicos. Por ejemplo, el procedimiento de preparación del inóculo varía considerablemente de método a método. La confiabilidad de cualquier prueba de susceptibilidad para detectar bacterias resistentes a los antimicrobianos depende del seguimiento preciso de las instrucciones.

MATERIALES

Panel de Microdilución en Caldo de CIM

La prueba de microdilución en caldo de CIM se realiza en una placa de poli-estireno que contiene aproximadamente 96 celdillas. Una placa puede contener de 7 a 8 diluciones de 12 diferentes agentes antimicrobianos. Una celdilla sirve como control positivo (caldo más inóculo), y otro sirve como control negativo (sólo caldo). La mayoría de los sistemas tienen un volumen de 0.1 mL en cada celdilla.

Para facilitar el uso de agentes antimicrobianos apropiados contra cepas específicas, un laboratorio por lo general tiene un tipo de placa para bacterias gram-positivas y otro para bacterias gram-negativas. Para probar cepas aisladas de orina, algunos laboratorios tienen un tipo diferente de placa que contiene medicamentos apropiados para tratar infecciones de las vías urinarias bajas. Para probar bacterias fastidiosas se requieren paneles con medios especiales.

El caldo Mueller-Hinton se recomienda como el medio preferido para pruebas de susceptibilidad de organismos comúnmente aislados, aeróbicos o facultativos de rápido crecimiento. El caldo debe tener el contenido apropiado de cationes suministrado por el fabricante (Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺). Cada lote debe ser analizado con un medidor de pH después que el medio se haya preparado. El pH debe estar entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente (25° C). Para organismos fastidiosos como *Streptococcus pneumoniae* el caldo Mueller-Hinton puede ser suplementado con 2-5% de sangre de caballo lisada.

El desempeño de cada lote de caldo es evaluado utilizando una colección estándar de organismos de control de calidad. Si un nuevo lote de caldo no produce los resultados esperados, el contenido de cationes del caldo así como cada paso de la prueba debe ser investigado. Mientras tanto un lote diferente debe ser evaluado.

Pruebas de Dilución en Agar de CIM

En el método de dilución en agar, el agente antimicrobiano es incorporado en el medio con cada placa que contenga una concentración diferente del agente antimicrobiano. Los inóculos pueden ser aplicados rápida y simultáneamente a las superficies de agar utilizando un aparato de replicación del inóculo. La mayoría de replicadores disponibles transfieren de 32 a 36 inóculos a cada placa.

El agar Mueller-Hinton es preparado de una base deshidratada. El pH del agar debe estar entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente. No deben añadirse cationes suplementarios. Puede ser suplementado con 5% de sangre de cordero desfibrinada o sangre de caballo lisada en el caso de *Streptococcus pneumoniae*.

Las ventajas de las pruebas de dilución en agar incluyen la reproducibilidad de los resultados y el crecimiento satisfactorio de la mayoría de organismos no fastidiosos. Sin embargo, sus desventajas incluyen el trabajo requerido para preparar las placas de dilución en agar y su relativamente corto tiempo de almacenamiento. Generalmente las pruebas de dilución en agar no se realizan en laboratorios clínicos de rutina pero pueden ser ideales para laboratorios regionales de referencia o laboratorios de investigación que deben analizar un gran número de cepas.

Procedimiento para las Pruebas de CIM por Microdilución en Caldo

Nota: Los procesos de selección de colonias para evaluar, preparar y estandarizar la suspensión del inóculo para pruebas de CIM son los mismos que los descritos en el Capítulo 4 para difusión por disco.

Es importante preparar todos los materiales antes de empezar la prueba de CIM.

1. Células para el inóculo
Las colonias aisladas deben ser seleccionadas de un cultivo en placa de agar nutritivo después de 18 a 24 horas. Se debe usar un medio no selectivo, como agar sangre.
2. Prepare la suspensión del inóculo.
 - a. Método de crecimiento
 - De la placa de agar, seleccione de tres a cinco colonias bien aisladas y con el mismo tipo morfológico. La parte superior de cada colonia se toca con un asa de alambre y se transfiere a un tubo que contenga 4-5 mL de caldo apropiado, como caldo tríptico de soya.
 - El caldo de cultivo se incuba a 35°C hasta que alcance la turbidez equivalente a 0,5 del estándar de McFarland (usualmente 4-6 horas).
 - La turbidez del cultivo creciendo activamente en caldo se ajusta con solución salina o caldo estéril. La suspensión resultante contiene aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ (UFC/mL). Para ejecutar este paso apropiadamente, se debe usar ya sea un aparato fotométrico o, si se hace visualmente, luz adecuada para comparar visualmente el tubo con el inóculo y el estándar de McFarland al 0,5 frente a una cartulina con fondo blanco y rayas negras de contraste. Ver Figura 4,2 en el Capítulo 4.
 - b. Método de suspensión directa de colonias
 - Como un método alternativo, el inóculo puede ser preparado efectuando una suspensión directa en caldo o solución salina de las colonias aisladas y ajustando su turbidez a 0,5 del estándar de McFarland. Este método es recomendado para analizar organismos fastidiosos como *Haemophilus spp.*, *N. gonorrhoeae*, estreptococos y para probar resistencia potencial de estafilococos a la meticilina u oxacilina.
3. Mezclar la suspensión del inóculo antes de diluirlo.
Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de turbidez del inóculo al 0,5 del estándar de McFarland, mezcle la suspensión y dilúyala para que la concentración final en cada celdilla sea 5×10^5 (UFC/mL). Añada 2,0 mL de la suspensión original a 38 mL de agua (dilución 1:20). Las puntas del inoculador repartirán 0,01 mL (dilución 1:10) en cada celdilla. Inocule cuidadosamente la placa de CIM para evitar salpicar de una celdilla a otra. (Ver figura 5.1.)
Si no se ajusta y diluye el inóculo dentro de 15 minutos después de preparado se puede afectar la concentración de microorganismos y por consiguiente los resultados de la prueba.
4. Control de pureza del inóculo
Tome un asa llena con la suspensión de la celdilla con el cultivo control de crecimiento o del reservorio del inóculo, y proceda a realizar un subcultivo en una placa de agar sangre. Incube durante la noche a 37° C en 3-5% de CO₂, la cual es una atmósfera que favorece la detección de una amplia gama de contaminantes. Examine para comprobar que no haya contaminación antes de proceder con la lectura de la placa de CIM.

Dilución del Inóculo Estandarizado para Pruebas de CIM

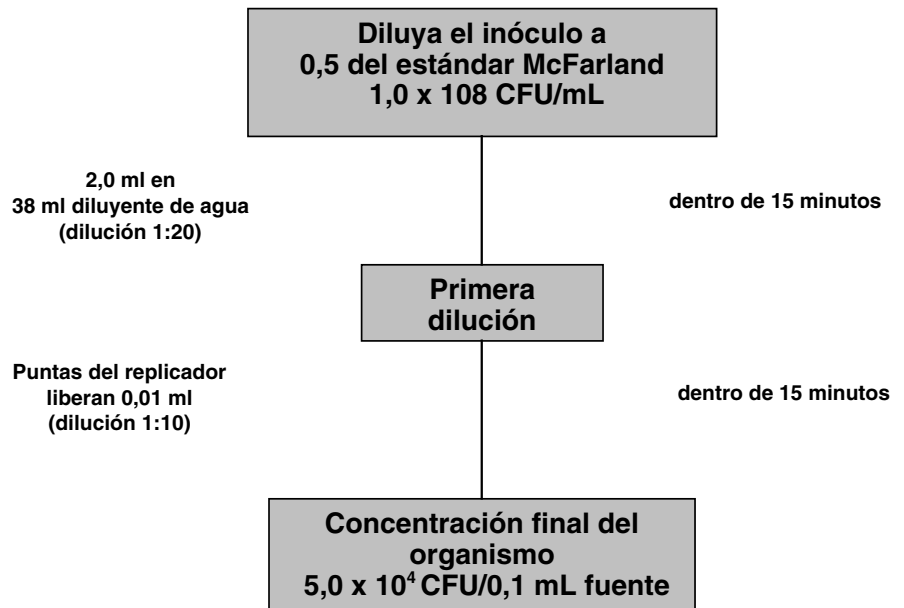


Figura 5.1—Flujograma para dilución del inóculo estandarizado para pruebas de CIM

5. Para prevenir que los paneles se deshidraten durante la incubación, tome una de las siguientes medidas:
 - Ponga un sello plástico sobre la placa, o
 - Ponga la placa en una funda plástica, o
 - Ponga la placa en otro tipo de recipiente, o
 - Ponga una tapa plástica o una placa de microdilución vacía encima de la placa.
6. Incubar las placas que contienen bacterias no fastidiosas en aire ambiental a 35°C por 16-20 horas; no apile más de cuatro placas.
7. Precauciones especiales de incubación:

Los resultados para bacterias no fastidiosas y la mayoría de agentes antimicrobianos pueden ser leídos y reportados después de 16-20 horas. Sin embargo, para detectar resistencia a ciertos agentes antimicrobianos, el procedimiento debe modificarse para:

 - Estafilococos – incube la oxacilina y vancomicina por 24 horas.
 - Enterococos – incube vancomicina, alto nivel de resistencia a gentamicina (prueba de sinergia) y alto nivel de resistencia a estreptomycinina (prueba de sinergia) por 24 horas. Si los resultados son negativos para estreptomycinina a las 24 horas, reincube por 24 horas más antes de reportar resultados (un total de 48 horas). Los resultados de resistencia pueden ser reportados cuando se detecten.

Para mayor información, consulte los Capítulos 8 y 9 de este manual.

Medios de Cultivo y Condiciones de la Incubación

Para analizar bacterias fastidiosas con microdilución en caldo, use los medios de cultivo y las condiciones de incubación recomendados por el NCCLS como se muestran en el siguiente cuadro:

Como Leer las Placas de CIM

1. Retire la placa de CIM y la placa de control de pureza de las incubadoras.
2. Examine la placa de control de pureza utilizando luz reflejada y luego utilizando luz transmitida. A veces la contaminación suele ser casi imperceptible.

Organismo	Medio	Incubación	
		Tiempo (hrs.)	Atmósfera ^b
<i>Haemophilus</i> spp	HTM ^a	20–24	Aeróbica
<i>S. pneumoniae</i>	CAMHB ^c + 2–5% LHB ^d	20–24	Aeróbica
Otros Strep. spp	CAMHB + 2–5% LHB	20–24	Aeróbica

^a Medio de prueba para *Haemophilus*

^b Como se menciona arriba, las placas de control de pureza son incubadas en 3–5% CO₂

^c Caldo Mueller Hinton con ajuste de cationes

^d Sangre de caballo lisada.

Si la placa de control de pureza se muestra contaminada, la prueba de CIM no puede ser interpretada y debe ser repetida.

3. Revise el crecimiento en la celdilla de control positivo. Se debe encontrar turbidez o un punto de crecimiento >2 mm lo cual indica crecimiento adecuado en el panel de CIM.
4. Revise el pozo de control negativo. Esta debe estar claro, sin turbidez.
5. Lea el punto final CIM como la concentración más baja del agente antimicrobiano que *inhibe completamente* el crecimiento del organismo detectado por observación directa sin ayuda de ningún aparato óptico. Ver Figura 5.2.

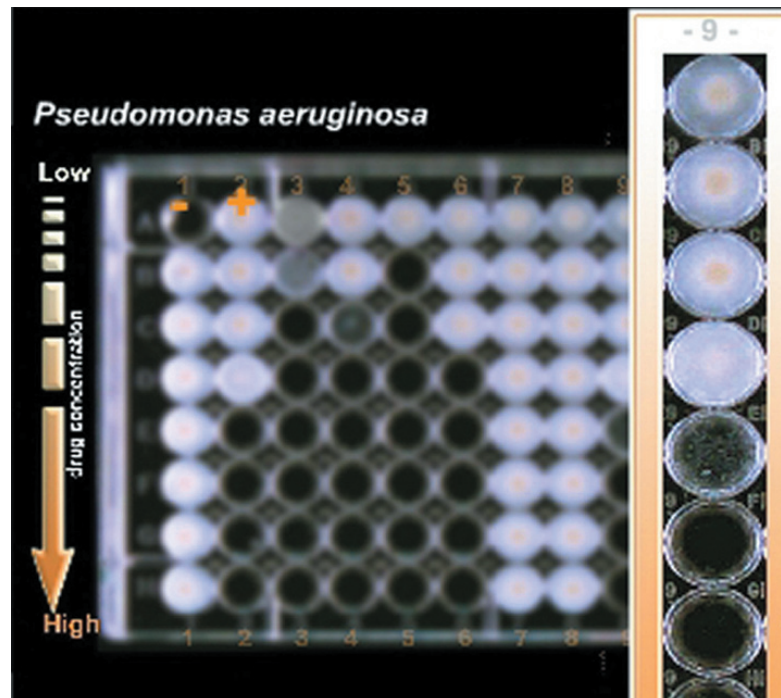


Figura 5.2.—Una placa de microdilución de CIM

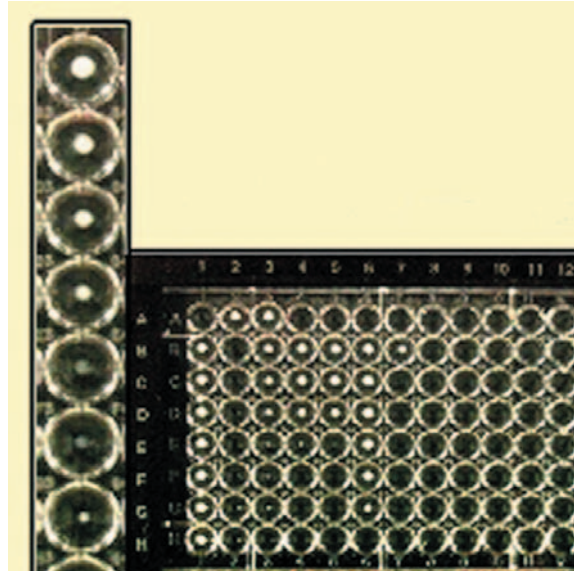


Figura 5.3.—CIM con arrastre

6. Para trimethoprim, sulfonamidas y trimethoprim-sulfamethoxazole, lea el punto final a la concentración donde la reducción en el crecimiento es >80% comparada con el control positivo.
7. Algunos agentes, particularmente los agentes bacteriostáticos, pueden demostrar una muy ligera opacidad o pequeños puntos de crecimiento (<2 mm) en varias celdillas sucesivas. A esto se conoce como “arrastre.” Generalmente, este crecimiento incipiente puede ser ignorado a menos que ocurra con lo siguiente:
 - Oxacilina o vancomicina cuando se estén analizando estafilococos
 - Vancomicina cuando se estén analizando enterococos

Como Interpretar los Resultados de CIM

El documento M7 del NCCLS (Tablas 2A–2J) contiene los criterios de interpretación de CIM (conocidos también como puntos de corte) que necesitará para interpretar los resultados de sus pruebas de CIM. Si no está familiarizado con el uso del documento M7 consulte el Capítulo 3 de este manual.

Control de las variables de la prueba

Las siguientes variables DEBEN ser controladas en la realización de la prueba de microdilución en caldo de CIM:

- Concentración del inóculo
- Determinación del punto final
- Atmósfera de incubación
- Temperatura de incubación

- Tiempo de incubación
- Composición del medio (para los detalles ver nota de pie de página 1 al final de este capítulo)
- pH del medio

Concentraciones Antimicrobianas Analizadas

El número de diluciones y el rango de concentraciones probadas pueden variar entre los paneles de microdilución para los diferentes agentes antimicrobianos.

El rango de concentraciones analizadas debe abarcar los puntos de corte de interpretación y la CIM anticipada para el organismo de control de calidad.

En una prueba de CIM de “rango completo” generalmente son analizadas entre 6-8 diluciones.

Las placas que incluyen solo aquellas concentraciones que definen los puntos de corte (típicamente sólo 2 o 3 diluciones) son llamados placas de corte. Las placas de corte son por lo general difíciles para el control de calidad porque los resultados de control de calidad típicamente se hallan por debajo o por encima de las concentraciones de la placa.

La siguiente tabla presenta las categorías de interpretación para ampicilina. Para la placa de corte, solo tres concentraciones son evaluadas y éstas representan a las interpretaciones de susceptible, intermedia y resistente.

Paneles de rango completo versus límites de CIM

Rango Completo de CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Límites de CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Interpretación
0,5	–	Susceptible
1,0	–	
2,0	–	
4,0	–	
8,0	8,0	
16,0	16,0	Intermedia
32,0	32,0	Resistente

1. Los componentes importantes del caldo Mueller-Hinton (MHB) utilizado para bacterias no fastidiosas se enumeran a continuación:

Cationes:

El MHB es suplementado con calcio y magnesio para alcanzar concentraciones que se aproximan a las concentraciones fisiológicas. Estas corresponden a 25 mg/L de calcio y 12,5 mg/L de magnesio. Cuando el caldo es suplementado se le conoce como caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes o CAMHB. Si la concentración de estos cationes es demasiado alta, podría ocurrir una falsa resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los aminoglucósidos. Una baja concentración de cationes tiene el efecto opuesto (posible falsa susceptibilidad). A altas concentraciones los cationes se unen a las tetraciclinas y disminuyen su actividad en contra de todas las bacterias (las bajas concentraciones tienen el efecto opuesto).

Timidina:

Use el CAMHB que no contiene o contiene muy bajas concentraciones de timidina. Las concentraciones excesivas pueden resultar en falsa resistencia a las sulfonamidas, trimethoprim y trimethoprim-sufamethoxazole.

Para asegurarse de que cada lote de CAMHB tiene concentraciones aceptables de timidina, haga una prueba con la cepa de control de calidad *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y trimethoprim-sufamethoxazole. La CIM debe ser $<0,5/9,5 \mu\text{g/mL}$ para que el medio sea considerado aceptable.

Otros:

Pruebe oxacilina y otras penicilinas estables a la penicilinasas en CAMHB que contenga 2% NaCl.

Realice pruebas de alto nivel de aminoglucósidos o pruebas de tamizaje para detectar sinergia para enterococos en caldo de infusión cerebro corazón o caldo de fosfato y dextrosa.

Control de Calidad

Cepas de Control de Calidad:

El control de calidad de las pruebas de CIM involucra probar las cepas de referencia ATCC recomendadas por la NCCLS. Esto es explicado en detalle en el capítulo de Garantía de Calidad y Control de Calidad.

Concentración del inóculo:

Puesto que la concentración de organismos en el inóculo es crítica para alcanzar resultados precisos, se sugiere hacer un seguimiento periódico de esta variable usando el procedimiento que se esboza a continuación para determinar el número de organismos en la celdilla de control de crecimiento de una placa de CIM.

1. Inmediatamente después de la inoculación de una placa de prueba de microdilución, transfiera 0,01 mL de la celdilla de control de crecimiento a 10 mL de solución salina. Vortex.
2. Transfiera 0,1 mL de esta dilución a un medio de agar y proceda a esparcirla para que se disperse completamente. Repita el procedimiento en una segunda placa de agar.
3. Después de la incubación durante la noche (16-20 horas), cuente el número de colonias presentes en el agar y determine el número promedio de colonias en ambas placas.
4. Una cuenta aceptable es un promedio entre 30-100 colonias. Cuando se multiplica por el factor de dilución de 10^4 , el resultado indica una concentración del inóculo de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL.

Otros Métodos de CIM

Dilución en agar

El documento M7 del NCCLS incluye recomendaciones para realizar las pruebas de dilución en agar de CIM y ofrece las condiciones recomendadas de prueba para lo siguiente:

Organismo	Medio	Incubación	
		Tiempo (hrs.)	Atmósfera
Bacterias no exigentes	MHA ^a	20–24	Aeróbica
Otros Strep. spp.	MHA & 5% sangre de cordero	20–24	Aeróbica
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	GC ^b base de agar	20–24	CO ₂ (5%)

^a Agar Mueller-Hinton

^b Gonocócica

Debido al trabajo requerido y las limitaciones de almacenamiento, la prueba de dilución en agar generalmente no se realiza en laboratorios clínicos de rutina.

Macrodilución en Caldo

En este método, las dos diluciones finales del antibiótico son preparadas volumétricamente en el caldo. Para la prueba se requiere un volúmen final mínimo de 1 mL de cada dilución. Dentro de los 15 minutos siguientes a la estandarización del inóculo, como se describió anteriormente, se añade 1 mL del inóculo ajustado a cada tubo que contiene el agente antimicrobiano. Cada tubo es agitado e incubado a 35°C por 16 a 20 horas en una incubadora de aire ambiental. La CIM es la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del organismo en los tubos detectada por observación directa sin ayuda de ningún aparato óptico. Generalmente, la microdilución de CIM para bacilos gram negativos o la doble dilución son más bajas que la macrodilución comparable de CIMs.

Realización de pruebas de CIM vs. Difusión por disco

Las pruebas de CIM son necesarias para ciertas combinaciones de organismos/antimicrobianos para las cuales se ha probado que las pruebas de difusión por disco no son confiables. Estas incluyen:

Streptococcus pneumoniae

Penicilina – realice una prueba de CIM de penicilina cuando las cepas aisladas muestren halos de inhibición <19 mm alrededor de los discos de oxacilina (una prueba de “detección” de resistencia a la penicilina).

Cefotaxima o ceftriaxone – use una prueba de CIM porque no se han establecido puntos corte de difusión por disco para estos agentes.

Streptococcus viridans

Penicilina – determine las CIMs cuando las cepas aisladas provengan de lugares del cuerpo normalmente estériles.

Especie *Staphylococcus*

Vancomicina – realice pruebas de CIM de vancomicina para detectar susceptibilidad reducida a vancomicina ya que esta no se puede determinar usando la prueba de difusión por disco.

CASO DE ESTUDIO

Un hombre de 35 años de edad sufrió severas lesiones en su torso y piernas como consecuencia de un accidente en motocicleta. Las lesiones hicieron necesaria la amputación de su pierna izquierda. Una semana después de su admisión en la unidad quirúrgica de terapia intensiva, el sitio de la amputación se puso rojo y edematoso. Los cultivos del sitio revelaron la presencia de *P. aeruginosa*. El médico contactó el laboratorio para obtener los resultados de las pruebas de susceptibilidad y el microbiólogo sólo le dió un informe verbal de los resultados cualitativos (susceptibles, intermedios y resistentes). El médico pidió los resultados de la CIM para gentamicina y tobramicina, a pesar que ambos medicamentos fueron reportados como susceptible.

Un microbiólogo debe entender la razón del interés del médico por obtener los resultados de CIM así como los resultados de susceptible, intermedia y resistente de las pruebas de la cepa de *P. aeruginosa* aislada de este paciente.

El reporte verbal del laboratorio incluyó lo siguiente:

Fuente del espécimen: Drenaje de herida

Resultados: *Pseudomonas aeruginosa*

Medicamento	Susceptibilidad
Ceftazidima	S
Ciprofloxacina	R
Gentamicina	S
Imipenem	S
Piperacilina	S
Tobramicina	S

¿Encuentra alguna diferencia entre gentamicina y tobramicina?

Ahora mire el reporte de CIM, ¿Encuentra alguna diferencia entre gentamicina y tobramicina?

Medicamento	Interpretación	CIM
Ceftazidima	S	<0,5
Ciprofloxacina	R	>4
Gentamicina	S	4
Imipenem	S	<0,5
Piperacilina	S	<8
Tobramicina	S	0,5

Los resultados de CIM tanto para gentamicina como para tobramicina están en el rango susceptible; sin embargo, la CIM de gentamicina es 8 veces mayor que la CIM de tobramicina y está en la línea marginal entre Susceptible e Intermedia. Por tanto la información de CIM sugiere que la tobramicina es un mejor agente que la gentamicina para esta infección.

Las infecciones serias causadas por la *P. aeruginosa* frecuentemente son tratadas con una combinación de un aminoglucósido y un agente beta-lactámico. Cuando el médico obtuvo los resultados, prescribió una combinación de tobramicina y ceftazidima. La infección del paciente cedió y, luego de 2 meses de hospitalización, fue trasladado a una unidad de rehabilitación.

REVISIÓN

Recuerde:

- Usar el estándar M7 del NCCLS más actualizado que proporciona las instrucciones para realizar la prueba de CIM en bacterias aeróbicas. Además, usar las tablas M100 del NCCLS más actualizadas como guía en la interpretación y reporte de resultados.
- Seguir las recomendaciones del fabricante, si usa un sistema comercial.
- Analizar la información a efectos de evaluar cualquier discrepancia de los resultados y tener un mejor control sobre la prueba.
- Estar al tanto de las excepciones del método estándar para analizar ciertas combinaciones de organismo/antimicrobiano.

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

1. ¿Qué documento del NCCLS proporciona instrucciones estándar para realizar pruebas de CIM en bacterias aeróbicas?
2. ¿Qué documento del NCCLS proporciona tablas de guía para interpretar y reportar resultados de difusión por disco y CIM?
3. ¿Cuáles son las excepciones al método estándar para analizar ciertas combinaciones de organismo/antimicrobiano?
4. ¿Es esencial obtener resultados de CIM versus resultados cualitativos (susceptible, intermedia y resistente) en todas las cepas aisladas de sangre?
 - A. Sí
 - B. No

6

Aseguramiento de Calidad/ Control de Calidad (AC/CC)

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Enumerar los componentes de un programa de aseguramiento de calidad para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.
- Identificar las cepas específicas de control de calidad recomendadas por el NCCLS para pruebas de difusión por disco y de CIM, y describir como deben mantenerse las cepas.
- Determinar si un resultado específico de una prueba está dentro del rango aceptable del agente antimicrobiano en la prueba de difusión en disco con una cepa de control de calidad.
- Discutir las acciones correctivas a tomar cuando el resultado diario o semanal de control de calidad esté fuera de rango.
- Describir una estrategia para verificar los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos de pacientes.

DEFINICIONES

CC –Control de Calidad: Conjunto de acciones que se aplican en el laboratorio durante la ejecución de cada prueba para asegurar que las mismas están llevándose a cabo de manera correcta.

AC – Aseguramiento de Calidad: Programa diseñado para dar seguimiento y evaluar la calidad en el transcurso del proceso de cada prueba y en forma global en la totalidad del proceso, incluyendo las fases pre-analíticas, analíticas y post-analíticas.

SC –Sistemas de Calidad: Programa que abarca a toda la institución para asegurar que la “ruta de flujo de trabajo” relacionada con cualquier prueba está funcionando de acuerdo a criterios preestablecidos.

Acción Correctiva: La respuesta necesaria cuando se identifica cualquier problema mediante CC, AC o SC

PROGRAMA DE CC PARA PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA (PSA)

Los componentes de un Programa de Aseguramiento de Calidad integral para PSA son:

- Cepas de CC para prueba de referencia (15%)
- Competencia técnica (15%)

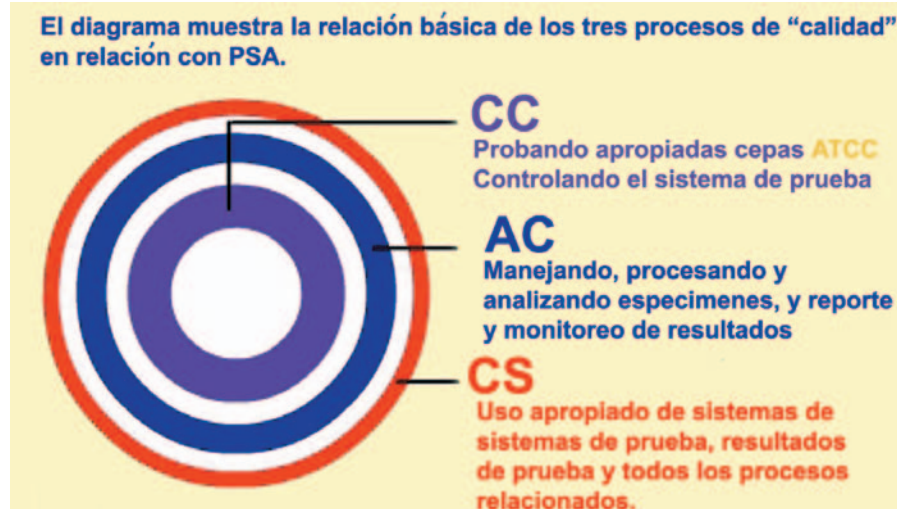


Figura 6.1—Un diagrama “ojo de toro” de AC/CC/SC

- Verificación del antibiograma del organismo (15%)
- Estrategias de pruebas clínicamente relevantes (15%)
- Revisión de resultados por parte del supervisor (15%)
- Manual de procedimientos (10%)
- Antibiograma cumulativo (5%)
- Estudios sobre habilidades (5%)
- Otros (5%)

Los porcentajes reflejan la cantidad relativa del esfuerzo requerido en un laboratorio clínico para cada componente.

“Verificación del antibiograma del organismo” se refiere a la revisión de los resultados de los aislamientos de cada paciente para asegurarse que el antibiograma es consistente con la identificación del germen aislado.

Los requerimientos específicos de CC para PSA, además de los requerimientos generales para AC y CC estipulados en las Enmiendas para el Mejoramiento del Laboratorio Clínico de 1988 (CLIA), incluyen:

- Revisar cada nuevo lote de medios y cada lote de discos antimicrobianos antes de iniciar su uso (o en forma concurrente), utilizando cepas de referencia aprobadas.
- Verificar que los tamaños de las zonas de difusión en disco o valores de CIM para las cepas de referencia estén dentro de los rangos establecidos antes de reportar los resultados de PSA.
- Usar las cepas apropiadas de control para revisar la precisión del procedimiento cada día que las pruebas se realicen.
- Probar las cepas de control con una periodicidad quincenal, bajo la condición que los estándares del NCCLS para PSA diarios estén cumplidos; o realizar el control de calidad diario según se indica en los estándares del NCCLS.

Puede consultar las CLIA en el sitio web <http://www.cms.hhs.gov/clia>.

Cepas de CC – general

El NCCLS recomienda el uso de cepas ATCC para el CC de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. El CC se realiza para garantizar que el sistema de prueba está funcionando adecuadamente. En este capítulo nos concentraremos en el método de difusión por disco para ilustrar puntos claves. Las recomendaciones para CC de las pruebas de CIM son similares.

Cepas de CC –rangos aceptables

Los rangos aceptables para las cepas de CC están enumerados en las Tablas 3 o 3A del documento M100 del NCCLS.

Sugerencia técnica: La Tabla M100 del NCCLS se actualiza anualmente; los rangos de CC podrían añadirse o modificarse con cada actualización. Los datos nuevos son siempre enumerados en negrilla dentro del documento M100.

Cepas de CC – selección para prueba

Cuando seleccione las cepas de CC para realizar pruebas:

- Empiece con la(s) cepa(s) de CC que más se asemeje(n) a los aislamientos de los pacientes que estén siendo analizados.
- Concéntrese en las cepas de CC que tienen rangos definidos de CC para los antimicrobianos que serán probados según se enumera en las Tablas 3 y 3A.
- Los rangos de CC definidos por el NCCLS son válidos solo cuando se usan métodos de referencia del NCCLS o métodos que han demostrado un desempeño comparable a estos.
- Refiérase a las Tablas 2A-2H del NCCLS, que enumeran las recomendaciones mínimas de CC para un grupo específico de organismos. Como ejemplo: Aquí puede observar las cepas de CC recomendadas cuando se analicen aislamientos de *Enterobacteriaceae*.

Recuerde que debe usar las condiciones de prueba recomendadas para el respectivo grupo de organismos. Por ejemplo, para pruebas de *Enterobacteriaceae*:

Medio: Agar Mueller Hinton

Inóculo: Método de crecimiento o suspensión directa de colonias

Incubación: 35°C aire ambiente; 16-18 horas

Sugerencia técnica: Pruebe las cepas de CC de idéntica manera a la usada para las pruebas con aislamientos de pacientes.

Cepas de CC – descripción

Las cepas de CC recomendadas por el NCCLS han sido seleccionadas con base en su susceptibilidad o resistencia a un agente antimicrobiano en particular y su desempeño confiable cuando se prueben utilizando métodos de referencia del NCCLS.

Algunas cepas son usadas solo para CC de pruebas de difusión en disco, otras solo para pruebas de CIM; mientras algunas son usadas para ambas pruebas.

Algunas cepas son usadas solo para pruebas específicas de resistencia (eje., la cepa *S. aureus* ATCC 43300 es usada solo para la prueba “screen” de oxacilina en agar-sal).

Sugerencia técnica: Si está usando un sistema comercial de prueba, use las cepas de CC y procedimientos recomendados por el fabricante.

Cepas de CC de bacterias gram-positivas

A continuación se definen las características básicas y el uso primario de las cepas de CC de bacterias gram positivas según están descritas en los estándares del NC-CLS:

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Susceptible a ampicilina, vancomicina y altos niveles de aminoglucósidos

Use para CC de:

- Agentes antimicrobianos probados contra bacterias gram-positivas (CIM)
- Placa “screen” agar vancomicina (control negativo)
- Screening de resistencia a altos niveles de aminoglucósido (control negativo)
- Para asegurar que los medios sean aceptables para probar sulfonamidas, trimethoprim y trimethoprim-sulfamethoxazole (DD/CIM)

Enterococcus faecalis ATCC 51299

Resistente a vancomicina (cepa que contiene *vanB*) y altos niveles de aminoglucósidos

Use para CC de:

- Placa “screen” agar vancomicina (control positivo)
- Screening de resistencia a altos niveles de aminoglucósido (control positivo)

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Beta-lactamasa negativo.

Use para CC de:

- Agentes antimicrobianos probados contra bacterias gram-positivas (DD)

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Beta-lactamasa positivo

Use para CC de:

- Agentes antimicrobianos probados contra bacterias gram-positivas (CIM)

Staphylococcus aureus ATCC 43300

S. aureus resistente a meticilina/oxacilina (MRSA)

Use para CC de:

- Placa “screen” de oxacilina en agar-sal

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

Penicilina intermedia

Use para CC de:

- Pruebas neumocócicas (DD/CIM)

Cepas de CC para bacterias gram-negativas

A continuación constan las características básicas y el uso primario de las cepas de CC de bacterias gram-negativas según están descritas en los estándares del NCCLS:

Escherichia coli ATCC 25922

Beta-lactamasa negativa

Use para CC de:

- Agentes antimicrobianos probados contra bacterias gram-negativas (DD/CIM)

Escherichia coli ATCC 35218

Beta-lactamasa positiva

Use para CC de:

Combinación de agentes inhibidores de beta-lactámicos/beta-lactamasa (DD/CIM)

Sugerencias técnicas para prevenir la pérdida del plásmido de resistencia:

El caldo de cultivo debe ser almacenado a -60°C.

Evite realizar subcultivos repetidos del caldo porque las células que han perdido el plásmido pueden crecer más rápidamente que las células resistentes.

Haemophilus influenzae ATCC 49247

Beta-lactamasa negativo, resistente a ampicilina (BLNRA)

Use para CC de:

- *Haemophilus* spp. (DD/CIM)

Haemophilus influenzae ATCC 49766

Susceptible a ampicilina

Use para CC de:

- Cefalosporinas seleccionadas y *Haemophilus* spp. (DD/CIM)

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

Productora de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE)

Use para CC de:

- Pruebas screening y confirmatorias de BLEE (DD/CIM)
- Debe ser almacenada idealmente a -60°C para prevenir la pérdida de resistencia del plásmido

Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226

Resistencia a la penicilina cromosómicamente mediada

Use para CC de:

- *Neisseria gonorrhoeae* (DD/CIM)

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Cepa típica susceptible a los agentes anti-pseudomona

Use para CC de:

- Agentes antimicrobianos probados contra bacterias gram-negativas (DD/CIM)
- Medios para garantizar que el contenido de cationes y el pH sean satisfactorios, particularmente para probar aminoglucósidos

Cepas de CC – Mantenimiento

Cada laboratorio debe mantener una colección de cepas CC apropiada de acuerdo a sus necesidades. Estas cepas deben almacenarse en forma adecuada para preservar sus características de susceptibilidad antimicrobiana.

Para almacenamiento de largo plazo de caldos de cultivo, use una de las siguientes opciones:

- Almacene en un medio estabilizador apropiado, como caldo de soya tripticasa con 10-15% de glicerol o sangre de cordero desfibrinada (preferiblemente a 60°C)
- Almacénelas liofilizadas (congelación seca)
- Obtenga caldos de cultivo liofilizados comercial.
- Para trabajar con caldos de cultivo una vez al mes (o más frecuentemente, si es necesario):
- Subcultive del caldo de cultivo permanente (congelado o liofilizado) a medios sólidos en placa.
- Subcultive 4-5 colonias aisladas de medios en placa a un tubo tapa rosca con agar inclinado e incube durante la noche, para preparar caldo de cultivo listo para trabajar.
- Almacene cepas no fastidiosas en tubos pico de flauta con agar tripticasa soya inclinado y cepas fastidiosas en agar chocolate inclinado, a 2-8°C.

Dos días antes de las pruebas de CC:

- Subcultive el crecimiento del agar inclinado a medios en placa e incube durante la noche.
- Seleccione 4-5 colonias aisladas de la placa para la prueba de CC y pruebe con el mismo método usado para los aislamientos de pacientes.

Cepas de CC – Documentación

Los resultados de todas las pruebas de CC de difusión en disco deben ser debidamente documentados en una hoja de registro de CC. Observe la descripción de la información requerida en esta hoja de registro.

Sugerencia técnica: Los resultados para las cepas de CC deben estar dentro de los rangos especificados por el NCCLS para que la prueba sea aceptable.

Hoja de registro de CC

Antimicrobiano	AM	CZ	CIP	CAZ	GM	PIP					
Potencia del Disco	10	30	5	30	10	100					
# de Lote de Disco											
Fecha de Apertura											
Fecha de Expiración											
Rango Estándar (mm)	16–22	23–29	30–40	25–32	19–26	24–30					
Fecha de Inicio	Tec.	Tec. Rev. ^b						Fabricante			A.C. ^c
								Medios	# Lote	Fecha de Expiración	

^a En el laboratorio este cuadro se imprimirá en el eje longitudinal de la página para que haya suficiente espacio para anotar la información.

^b Un/a segundo/a tecnólogo/a (o supervisor) quien revisa el trabajo y el resultado.

^c A.C. Acción Correctiva.

Cepas de CC – Frecuencia de Prueba

Cada día que se realicen pruebas de susceptibilidad en aislamientos de pacientes se debe probar cepas de CC apropiadas. Se debe tomar acciones correctivas si más de 1 en 20 resultados diarios de CC para una determinada combinación medicamento/organismo está fuera de rango.

Sin embargo, si se puede establecer un desempeño satisfactorio de las pruebas de CC de difusión por disco o CIM siguiendo los estándares del NCCLS, y los resultados se encuentran dentro de los rangos del NCCLS y están claramente documentados en los registros de CC de su laboratorio, el laboratorio puede cambiar a una rutina semanal de CC y probar sus cepas de CC una vez por semana.

Pruebe las cepas de CC para pruebas “screen” diariamente o cada vez que realice la prueba.(eje. ERV, MRSA)

Como Cambiar el CC de diariamente a semanalmente

Para demostrar el perfeccionamiento establecido en las pruebas diarias de CC:

- Pruebe las cepas apropiadas de CC y agentes antimicrobianos por 30 días de prueba consecutivos (no días calendario). Registre los resultados para cada agente, cada día que este sea probado.
- Para cada combinación medicamento/organismo, no más de 3 de 30 zona-halos de inhibición (o resultados de CIM) podrían estar fuera del rango aceptable de CC definido por el NCCLS. Sin embargo, si cualquier resultado medicamento/organismo está fuera de rango por dos días consecutivos, esto debe ser investigado.
- Si las condiciones anteriores se cumplen, puede empezar a realizar CC semanalmente, si desea.

Rutina Semanal de CC

Pruebe las cepas de CC una vez cada semana por siete días.

Siempre pruebe las cepas de CC antes de usar (o en forma concurrente) un nuevo lote de materiales (agar, discos, estándar McFarland, etc...) para realizar pruebas en aislamientos de pacientes.

Pruebe cepas de CC por 30 días si:

- Un nuevo sistema de prueba es introducido
- Un nuevo antimicrobiano es añadido a su batería de pruebas.
- Un cambio importante en el método de prueba es adoptado, como:

Conversión de mediciones manuales de zonahalos de inhibición a un lector automatizado (para pruebas de difusión por disco)

Uso de un fabricante diferente de caldos de cultivo para los paneles o un método diferente para lectura de pruebas de CIM

Introducción de un nuevo panel con diferentes concentraciones de la droga

Pregunta #1

¿Por qué probamos las cepas de CC con perfiles conocidos de susceptibilidad antimicrobiana y resistencia? Seleccione todas las opciones que apliquen.

- A. Para asegurar que los medios se desempeñen satisfactoriamente.
- B. Para asegurar que la carga antimicrobiana (disco o tubo de CIM) es exacta.
- C. Para asegurar que el inóculo es preparado y estandarizado adecuadamente.

- D. Para asegurar que los materiales de prueba no están contaminados.
- E. Para asegurar que subpoblaciones de bacterias resistentes sean siempre detectadas.
- F. Para asegurar que los límites sean medidos confiablemente.
- G. Para verificar la competencia de los/as tecnólogos/as en la realización de la prueba.

Respuesta:

Todas excepto E son correctas. Las cepas de CC no contienen subpoblaciones de bajo nivel de resistencia; sin embargo, resistencia de bajo nivel podría ser encontrada entre los aislamientos de pacientes. En consecuencia, el desempeño satisfactorio de las cepas de CC no garantiza que todos los tipos de bajo nivel de resistencia siempre sean detectados entre los aislamientos con todos los sistemas de prueba.

Pregunta #2

Usted está trabajando en un servicio de salud estudiantil que cultiva principalmente especímenes de heridas y de infecciones de vías urinarias no complicadas. Los *Staphylococcus aureus* aislados de infecciones de la piel son analizados mediante difusión por disco.

¿Que cepas de CC para bacterias gram-positivas probaría? Seleccione de la siguiente lista de cepas ATCC de CC recomendadas por el NCCLS:

- A. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- B. *Enterococcus faecalis* ATCC 51299
- C. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- D. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- E. *Staphylococcus aureus* ATCC 43300
- F. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

Respuesta:

- A. Incorrecta. No hay rango de difusión por disco del NCCLS para *E. faecalis* 29212.
- B. Incorrecta.
- C. Correcta.
- D. Incorrecta. Esta cepa de *S. aureus* es para CC de pruebas de CIM.
- E. Incorrecta. Esta cepa de *S. aureus* es para CC de la prueba "screen" de agar-sal oxacilina.
- F. Incorrecta.

Pregunta #3

Escenario: Su panel de CIM para analizar *Enterobacteriaceae* incluye ciprofloxacina en concentraciones de 0,12 – 4,0 µg/mL. ¿Cuál de las siguientes cepas sería la mejor para el CC de ciprofloxacina?

- A. *Escherichia coli* ATCC 25922
- B. *Escherichia coli* ATCC 35218
- C. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Respuesta:

- A. Incorrecta. El rango aceptable es 0,004-0,016 µg /mL. El rango aceptable de CC para *E. coli* ATCC 25922 está por debajo de la concentración más baja

incluida en el panel. Un resultado aceptable sería $<0,12 \mu\text{g}/\text{mL}$; sin embargo este resultado fuera de la escala no garantizaría que la prueba esté funcionando adecuadamente.

- B. Incorrecta. No hay rango de CC para ciprofloxacina y *E. coli* ATCC 35218.
- C. Correcta. El rango aceptable es $0,25\text{-}1,0 \mu\text{g}/\text{mL}$. El rango de CC para *P. aeruginosa* ATCC 27853 está dentro del rango de concentraciones de ciprofloxacina probadas en este panel, esto es, tiene un límite dentro de la escala.

Pregunta #4

Cuando se prueba ampicilina-sulbactam, ¿por qué debemos incluir *E. coli* ATCC 35218 además de *E. coli* ATCC 25922?

- A. *E. coli* ATCC 35218 es resistente a la ampicilina debido a la producción de beta-lactamasa y monitorea el sulbactam (componente inhibidor de beta-lactamasa) en el disco.
- B. *E. coli* ATCC 35218 es resistente a la ampicilina debido a proteínas de unión a penicilina alteradas y monitorea el sulbactam (componente inhibidor de beta-lactamasa) en el disco.
- C. *E. coli* ATCC 35218 es resistente al sulbactam en cambio *E. coli* ATCC 25922 no lo es.
- D. *E. coli* ATCC 35218 no crece tan bien como *E. coli* ATCC 25922 y es necesaria para el monitoreo del potencial del medio para apoyar el crecimiento.

Respuesta:

- A. Correcta.
- B. Incorrecta.
- C. Incorrecta.
- D. Incorrecta.

Pregunta #5

Un laboratorio quiere cambiar la rutina de CC de diariamente a semanalmente para pruebas de difusión por disco. Mire los resultados de 30 días de pruebas de ampicilina y *E. coli* ATCC 25922 para las cuales el rango aceptable de CC es 16-22 mm.

Registro de CC (30 Días)	
<i>E. coli</i> ATCC 25922—ampicilina	
Día	Zona (mm)
1	16
2	17
3	15
4	20
5	17
6	20
7	19
8	16
9	18
10	17
11*	
*	
*	
30*	

* Resultados de los días 11–30 están bajo control.

¿Puede ahora el laboratorio realizar el CC de las pruebas de difusión por disco para ampicilina y *E. coli* semanalmente?

- A. Sí
- B. No

Respuesta:

- A. Correcta. Sólo 1 de 30 resultados está fuera del rango aceptable de 16-22 mm.

Pregunta #6

Ahora mire los resultados de CC para cefazolina para los días 21-30. Durante los primeros 20 días, solo un resultado estuvo fuera del rango aceptable de 21-27 mm.

Registro de CC (30 Días)	
<i>E. coli</i> ATCC 25922 – cefazolina	
Día	Zona (mm)
1	*
*	*
16	20
*	*
20	*
21	24
22	25
23	23
24	25
25	25
26	19
27	25
28	20
29	23
30	20

* Excepto por el día 16, todos los resultados en los días 1–20 están en control.

¿Puede ahora el laboratorio realizar el CC de las pruebas de difusión por disco para cefazolina y *E. coli* semanalmente?

- A. Sí
- B. No

Respuesta:

- B. No, es la respuesta correcta. Hay cuatro resultados que están fuera del rango durante los 30 días de pruebas. El laboratorio no puede cambiar la rutina de CC para cefazolina a semanal.

Acción Correctiva

El laboratorio debe tomar las siguientes acciones correctivas antes de iniciar el CC semanal para cefazolina:

- El supervisor debe revisar la manera como se está utilizando el método de prueba y buscar desviaciones del protocolo estándar (eje. cualquier modificación o cambio introducido por el/la tecnólogo/a).
- Si la prueba de difusión por disco para cefazolina está siendo utilizada para los aislamientos de pacientes, los resultados de cefazolina deben retenerse porque podrían ser erróneos.
- Se podría explorar un método alternativo de prueba para cefazolina.
- Un número de lote diferente de materiales y reactivos debe ser usado para realizar otros 30 días de pruebas para cefazolina y *E. coli* ATCC 25922.
- Se debe probar en paralelo los lotes antiguos y nuevos de discos y MHA.

SI un resultado semanal de CC está fuera del rango y la razón es obviamente debida a:

- Contaminación
- Pruebas con la cepa incorrecta
- Pruebas con los medicamentos incorrectos
- Utilización de condiciones de prueba incorrectas (eje., tiempo de incubación o la atmósfera fue inadecuada)

ENTONCES pruebe nuevamente el agente problemático y la cepa adecuada de CC el día en que el problema sea identificado; si los resultados son aceptables, la acción correctiva ha sido completada.

SI un resultado semanal está fuera del rango y la razón y la solución al problema **NO SON** obvias:

ENTONCES inicie la acción correctiva:

- Pruebe nuevamente el agente problemático y la cepa de CC el día en que el problema sea identificado y por cuatro días adicionales.
- Si todos los cinco resultados están en control, vuelva a las pruebas de CC semanales.
- Si alguno de los cinco resultados está fuera de control, continúe con la acción correctiva para identificar la fuente del problema y corregirlo.
- Una vez que el problema es corregido, pruebe por 30 días adicionales consecutivos.

Sugerencia técnica: Registre todos los resultados, incluyendo aquellos que están fuera del rango, en el libro de registro de CC

Pregunta #7

Usted ha estado en una rutina semanal de CC. ¿Cuál de las siguientes variables requeriría ahora 30 días de pruebas diarias de CC? Seleccione todas las que apliquen:

- A. Usted cambia de ciprofloxacina a levofloxacina en su panel de orina para gram-negativas.
- B. Usted empieza a usar un nuevo número de lote de discos de ampicilina.
- C. Usted tiene una nueva/o tecnólogo/a realizando las pruebas de difusión por disco.
- D. Usted tuvo un problema con el CC semanal solo con gentamicina. El seguimiento diario durante 5 días demostró uno de cinco resultados fuera de control.

Respuesta:

- A. Correcta.
- B. Incorrecta. No es necesario realizar 30 días de pruebas de CC cada vez que un nuevo lote de materiales es usado.
- C. Incorrecta.
- D. Correcta. Solo la gentamicina requiere 30 días de pruebas; otros medicamentos pueden permanecer en una rutina semanal.

Pregunta #8

¿Cuándo sería apropiado realizar pruebas diarias de CC? Seleccione todas las que apliquen.

- A. Si los resultados de las cepas de CC están fuera del rango en 3 o más días durante el periodo de 30 días.
- B. Para medicamentos que son usados con poca frecuencia.
- C. Para laboratorios que realizan pruebas de susceptibilidad antimicrobiana con poca frecuencia.

Respuesta:

- A. Correcta. Las cepas de CC deben probarse diariamente y se debe tomar acciones correctivas para resolver el problema.
- B. Correcta.
- C. Correcta.

Pregunta #9

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 es usada solo para el CC de pruebas “screen” y confirmatorias de BLEE.

¿Cuál es la explicación más plausible si los resultados de esta cepa (cuando es usada para el CC de pruebas “screening” y confirmatorias de BLEE) están fuera de control en dos días sucesivos?

- A. La prueba está contaminada.
- B. El aislamiento, que estaba almacenado a -20°C, perdió su plásmido de resistencia.
- C. La prueba fue incubada a temperatura demasiado baja.

Respuesta:

- A. Incorrecta.
- B. Correcta.
- C. Incorrecta.

Acción Correctiva – Lista de control

Como parte de las acciones correctivas, asegúrese de revisar todas las siguientes:

- ✓ Zona-halos de inhibición o límites de CIM fueron medidos correctamente.
- ✓ El estándar de turbidez es homogéneo y libre de grumos y dentro de la fecha de vigencia
- ✓ La suspensión del inóculo fue preparada adecuadamente

- ✓ Los materiales de prueba fueron almacenados adecuadamente.
- ✓ Los materiales de prueba no han llegado o sobrepasado su fecha de expiración.
- ✓ La temperatura del incubador y la atmósfera están dentro de los rangos especificados y otros equipos están mantenidos adecuadamente.
- ✓ La cepa de CC usada para la prueba es aceptable. Siga las recomendaciones para el mantenimiento de las cepas de CC.
- ✓ La persona que está realizando las pruebas ha sido certificada como competente para realizar la prueba. Estos dos últimos ítems no figuran en el documento original

Problemas Fortuitos de CC

Los resultados de CC podrían estar fuera del rango debido a un error técnico fortuito o por casualidad. Estos problemas fortuitos de CC podrían ser por:

- Contaminación de la prueba de CC.
- Selección incorrecta de la cepa de CC. confusión
- Utilización de condiciones de prueba inadecuadas.

Es poco probable que los problemas fortuitos de CC tengan un impacto en los resultados de las pruebas de pacientes:

- Errores técnicos fortuitos podrían ocurrir solo por casualidad en una de 20 pruebas de CC.
- Cuando un resultado de CC está fuera del rango por un problema fortuito, repita la prueba en el mismo día en el que el problema es observado. Si el problema es de verás fortuito, el realizar la prueba nuevamente resolverá el problema y el resultado puede ser reportado al día siguiente.
- La acción correctiva para reportar resultados de pacientes cuando ocurre un problema fortuito de CC es relativamente simple. Los resultados de aislamientos de pacientes pueden ser reportados si:

La razón para que el resultado de CC esté fuera del rango es obvia y se relaciona solo con una de las cepas de CC, (esto es, otros resultados están en control).

Es probable que el resultado de CC que está fuera del rango sea correcto al repetir la prueba.

Problemas del Sistema de CC

Los resultados de CC podrían estar fuera del rango porque hay un problema de desempeño con el sistema o método de prueba.

- Los problemas del sistema podrían involucrar múltiples componentes del sistema de prueba.
- Los problemas del sistema por lo general contribuyen a resultados erróneos de pacientes si no son resueltos.
- Las acciones correctivas deben ser realizadas inmediatamente y documentadas.
- El procedimiento de acción correctiva para laboratorios que tienen una rutina diaria de CC es ligeramente diferente del procedimiento de acción correctiva para laboratorios con rutina semanal de CC.

Acción Correctiva—Resultados de Pacientes

Rutina diaria de CC

SI un agente está implicado, ENTONCES retenga los resultados para ese medicamento.

SI más de un agente está implicado, ENTONCES retenga todos los resultados de los pacientes. Para evitar demoras sustanciales en los reportes, considere una o más de las siguientes acciones:

- Use un método de prueba alternativo.
- Use diferentes lotes de materiales; sin embargo, si el problema no está relacionado con los materiales de prueba, esto podría demorar aún más los reportes.
- Envíe los aislamientos de los pacientes para su análisis a un laboratorio de referencia.

Rutina semanal de CC

SI se sospecha e identifica un problema del sistema en la rutina semanal de CC, ENTONCES:

- Revise retrospectivamente los resultados de susceptibilidad generados de aislamientos de pacientes desde la última vez que se obtuvo resultados de CC aceptables (aun si la revisión de la supervisión diaria no reveló ningún problema)
- Realice nuevamente la prueba de aislamientos de pacientes, si es necesario.
- Llame a los médicos y envíe reportes corregidos si es necesario.

Frecuentemente, los problemas del sistema son identificados cuando se verifican los resultados individuales de aislamientos de pacientes.

Acción Correctiva—Ejercicio #1

Para cada una de las siguientes, ¿el problema es más probable que sea fortuito o del sistema?

- A. Un único agente antimicrobiano está fuera del rango de una cepa de CC.
- B. Un único agente antimicrobiano está fuera del rango de más de una cepa de CC.
- C. Un único agente antimicrobiano está fuera del rango en más de un día de prueba.
- D. La prueba de CC aparece muy contaminada debido a la presencia de múltiples tipos de colonias dentro de una zona de inhibición.
- E. Los resultados de varios medicamentos están fuera del rango; sin embargo, los mismos lotes de materiales han estado en uso por dos semanas sin ningún problema.
- F. Varios agentes antimicrobianos están fuera del rango.

Respuesta:

- A. Fortuito.
- B. Sistema.
- C. Sistema.
- D. Fortuito.
- E. Fortuito. Posiblemente el organismo incorrecto fue utilizado solo ese día.

- F. Sistema. A menos que por confusión el organismo equivocado fue escogido para la prueba.

Responsabilidades del Usuario

El usuario debe asegurarse de que:

- Los productos son almacenados conforme a las especificaciones del fabricante.
- Los individuos que realizan las pruebas hayan demostrado competencia en la realización de las mismas.
- Los individuos que realizan las pruebas siguen las instrucciones del fabricante al pie de la letra y realizan en forma precisa la prueba recomendada de control de calidad.

Responsabilidades del Fabricante

El fabricante debe garantizar que:

- La potencia del agente antimicrobiano es exacta .
- La potencia del agente antimicrobiano es estable.
- El agente antimicrobiano en el disco, fuente o tira es adecuadamente identificado y contiene la forma química apropiada del agente (esto es: sal de sodio , sal, libre de ácido, etc.)
- El producto fue preparado en cumplimiento de los procesos de buena manufactura.

Los fabricantes deben mantener la rendición de cuentas para el proceso de manufactura y los productos.

Acción Correctiva—Ejercicio #2

Escenario: Su laboratorio realiza pruebas semanales de CC para pruebas de difusión por disco y ha estado utilizando durante las últimas tres semanas los mismos números de lote de materiales. Los resultados de gentamicina se presentan a continuación.

Día 1:

Resultado de gentamicina

Cepa de CC	Rango aceptable (mm)	Resultados del día de hoy (mm)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	19–26	14

Nota: la *P. aeruginosa* ATCC 27853 estuvo dentro de los rangos control para gentamicina. Al parecer el disco de gentamicina en *E. coli* ATCC 25922 no fue presionado lo suficiente para hacer contacto apropiado con la superficie de agar inoculado.

¿Qué debería hacer?

- Repetir la prueba de *E. coli* ATCC 25922 con los mismos materiales.
- Usar un nuevo lote de placas MHA.
- Usar un nuevo cartucho y un nuevo lote (si está disponible) de discos de gentamicina.

- D. Subcultivar un aislamiento fresco de *E. coli* ATCC 25922 de un caldo de cultivo congelado.

Respuesta:

- A. Correcta. Puesto que el problema es solo con *E. coli* ATCC25922 (pero no con *P. aeruginosa* ATCC 27853) y al parecer se debe al posicionamiento del disco, es altamente probable que este sea un problema fortuito debido a un error identificable.
 B. Incorrecta.
 C. Incorrecta.
 D. Incorrecta.

¿Qué haría con los resultados de aislamientos de pacientes?

- A. Retener los resultados para gentamicina y *Enterobacteriaceae* pero remitirlos para *P. aeruginosa*.
 B. Reportar gentamicina de acuerdo con las políticas de rutina.

Respuesta:

- A. Incorrecta.
 B. Correcta.

Día 2:

Resultado de gentamicina

Cepa de CC	Rango aceptable (mm)	Resultados del día de hoy (mm)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	19–26	20

¿Qué haría ahora? Seleccione todas las que apliquen.

- A. Registrar todos los resultados en el registro de CC y concluir que este fue un problema fortuito.
 B. Retomar la prueba semanal de CC y probar *E. coli* ATCC 25922 otra vez la próxima semana.
 C. Continuar las pruebas de *E. coli* ATCC 25922 y gentamicina con los mismos materiales por cuatro días más de pruebas.

Respuesta:

- A. Correcta.
 B. Correcta
 C. Incorrecta.

Acción Correctiva—Ejercicio #3

Escenario: Su laboratorio realiza pruebas semanales de CC para pruebas de difusión por disco. El día de ayer, usted abrió un nuevo cartucho de discos de imipenem y los usó por primera vez. Los resultados se muestran a continuación.

Día 1:

Resultado de imipenem

Cepa de CC	Rango aceptable (mm)	Resultados del día de hoy (mm)	
		Lote antiguo	Lote nuevo
<i>E. coli</i> ATCC 25922	26–32	22	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	20–28	17	

¿Qué haría con las pruebas de CC? Seleccione todas las que apliquen.

- A. Repetir la prueba con los mismos materiales.
- B. Usar un nuevo lote de placas MHA.
- C. Usar un nuevo cartucho y un nuevo lote (si está disponible) de discos de imipenem.
- D. Subcultivar un aislamiento fresco de cada cepa de CC de un caldo de cultivo congelado.

Respuesta:

- A. Incorrecta.
- B. Incorrecta.
- C. Correcta. El imipenem está entre los antibióticos menos estables que son probados rutinariamente en laboratorios clínicos. Si los discos fueron expuestos a temperaturas aumentadas por cualquier lapso de tiempo (eje., la caja con los discos estuvo en la zona de carga por varios días durante el verano), podría haber ocurrido un deterioro. Si está disponible, use un nuevo cartucho y un nuevo lote de discos de imipenem y pruébelos en paralelo con el antiguo lote.
- D. Incorrecta.

¿Qué haría con los resultados de las pruebas de aislamientos de pacientes?

- A. Retener todos los resultados.
- B. Retener todos los resultados de imipenem en bacterias gram-negativas probadas con el mismo cartucho de discos.
- C. Remitir todos los resultados del día de hoy que son claramente susceptibles o claramente resistentes, pero retener los resultados de imipenem que están cerca del límite y realizar la prueba nuevamente.
- D. Enviar todos los aislamientos que necesitan resultados de la prueba de imipenem a un laboratorio de referencia.

Respuesta:

- A. Incorrecta.
- B. Correcta.
- C. Incorrecta.
- D. Incorrecta.

Día 2:

Resultado de imipenem

Cepa de CC	Rango aceptable (mm)	Resultados del día de hoy (mm)	
		Lote antiguo	Lote nuevo
<i>E. coli</i> ATCC 25922	26–32	20	28
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	20–28	18	24

¿Qué haría ahora? Seleccione todas las que apliquen.

- A. Registrar los resultados en el registro de CC.
- B. Retomar la prueba semanal y probar las dos cepas de CC otra vez la próxima semana.
- C. Continuar probando ambas cepas de CC con imipenem (solo un nuevo lote) por cuatro días más de pruebas.
- D. Reportar los resultados con los discos del nuevo lote de imipenem de las pruebas de aislamientos de pacientes del día de hoy.

Respuesta:

- A. Correcta.
- B. Incorrecta.
- C. Correcta.
- D. Correcta.

Resultados de Pacientes—Lista de Control de Precisión

Para asegurar que los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos de pacientes sean precisos, cerciórese de que:

- ✓ Los resultados con cepas de CC están dentro del rango aceptable.
- ✓ El crecimiento es satisfactorio.
- ✓ La prueba no está contaminada (mezclada).
- ✓ El perfil global de susceptibilidad o el antibiograma es consistente con los resultados esperados para los agentes probados y la identificación del aislamiento; examine los resultados para todos los agentes antimicrobianos probados y no solo aquellos que serán reportados.
- ✓ La resistencia atípica, si está presente, sea confirmada.

Verifique los resultados inconsistentes y la resistencia atípica repitiendo:

- ✓ Las pruebas de identificación
y/o
- ✓ Las pruebas de susceptibilidad

PREGUNTA #10

¿Cuál de las siguientes condiciones podría contribuir a resultados erróneos de PSA en un aislamiento de un paciente aun cuando los resultados para las cepas de CC estén dentro del rango aceptable? Seleccione todas las que apliquen.

- A. Inóculo contaminado
- B. Malfuncionamiento esporádico del instrumento durante la lectura de resultados
- C. Límites difíciles de medir (eje., “trailing” con trimethoprim-sulfamethoxazole)
- D. Subpoblación resistente de baja frecuencia
- E. Errores de transcripción/técnicos

Respuesta:

- A. Correcta.
- B. Correcta.
- C. Correcta.
- D. Correcta.
- E. Correcta.

Lineamientos de Verificación

Verificación—Antibiogramas Típicos

Puesto que muchas especies bacterianas están asociadas con un antibiograma típico, el conocimiento de antibiogramas típicos puede ayudar a confirmar los resultados de aislamientos de pacientes. Sin embargo, con la resistencia emergente esto podría no siempre ser cierto.

Listas de los antibiogramas más comunes para varias especies pueden ser encontradas en las siguientes publicaciones:

- Isenberg, HD (ed). 1998. *Essential Procedures for Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Lorian, V. 2005. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Murray, PR, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Tenover, and RH Tenover (eds.). 2003. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Verificación—Sistemas Expertos

Los sistemas “expertos” (sistemas de software que revisan los patrones de resistencia de aislamientos bacterianos para identificar inconsistencias o resultados atípicos) con frecuencia están disponibles con instrumentos automatizados de PSA.

Algunos sistemas expertos utilizan las estadísticas institucionales acumuladas de susceptibilidad para detectar aislamientos inusuales. En consecuencia, si una cierta especie es típicamente susceptible (S) o resistente (R) a un agente antimicrobiano >90% del tiempo, el sistema detectaría un aislamiento que fue reportado con el resultado opuesto.

Ejemplo: Si 98% de aislamientos de *E. coli* son susceptibles a ciprofloxacina en una institución, los aislamientos que son resistentes son detectados para su seguimiento.

Verificación—Relacionamiento con Agentes Antimicrobianos

Generalmente, los medicamentos que están dentro de un tipo exhiben una jerarquía de actividad contra grupos de organismos específicos. Por ejemplo, contra *Enterobacteriaceae*, las cefalosporinas de 1^{ra} generación son menos activas que las cefalosporinas de 2^{da}, 3^{ra} o 4^{ta} generación.

El conocimiento de los diversos niveles de actividad dentro de un tipo de agentes antimicrobianos debe ser usado para evaluar el perfil global de los resultados obtenidos en aislamientos de pacientes.

Cuando se revisen los antibiogramas de aislamientos bacterianos, investigue los resultados cuando el medicamento típicamente “más activo” aparece menos efectivo que el medicamento que es típicamente “menos activo.”

Verificación – Relacionamiento con Cefalosporinas

La jerarquía típica de actividades para las cefalosporinas de 1^{ra}, 2^{da}, 3^{ra} y 4^a generación para grupos de organismos gram-negativos es:

(> significa que la actividad es mayor que, mientras que = significa que la actividad es comparable a)

Enterobacteriaceae

cefalosporinas 4^{ta} generación > cefalosporinas 3^{ra} generación

cefalosporinas >2^{da} generación > cefalosporinas 1^{ra} generación

P. aeruginosa (solo las cefalosporinas de 3^{ra} y 4^a generación son activas)

cefepime = ceftazidima > cefoperazona > ceftizoxima = ceftriaxone = cefotaxima

Verificación – Relacionamiento con las Penicilinas

Enterobacteriaceae

Piperacilina-tazobactam > piperacilina = mezlocilina > ticarcilina = carbenicilina > ampicilina

P. aeruginosa

Piperacilina-tazobactam = piperacilina > mezlocilina = ticarcilina > carbenicilina

Verificación a Verificar

El Apéndice A en el documento M39-A del NCCLS “Análisis y Presentación de Datos Acumulados de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana”, enumera “algunos hallazgos atípicos que sugieren la verificación de los resultados de susceptibilidad y la confirmación de la identificación del organismo.”

El Apéndice A lista ejemplos de perfiles de resistencia que todavía tienen que ser reportados o son identificados con poca frecuencia en un hospital.

Algunos resultados que podrían ser verificados repitiendo la prueba a menos que el paciente haya tenido el aislamiento previamente son:

- *Staphylococcus aureus* intermedia o resistente a vancomicina
- *Enterococcus faecalis* resistente a ampicilina o penicilina
- *Enterococcus faecium* resistente a quinupristina-dalfopristina o
- *Enterococcus faecalis* susceptible a quinupristina-dalfopristina
- Estreptococos beta-hemolíticos “no susceptibles” a penicilina
- *Enterobacteriaceae* resistente a amikacina
- *Enterobacteriaceae* resistente o intermedia a imipenem
- *Stenotrophomonas maltophilia* resistente a trimetoprim-sulfamethoxazole
- *Haemophilus influenzae* resistente a ampicilina y beta-lactamasa negativo o resistente a amoxicilina-ácido clavulánico o cefalosporinas de 3^{ra} generación
- Cualquier otro aislamiento que demuestre resultados de “no susceptible” para combinaciones de organismo/antimicrobiano para los cuales solo se ha definido criterios de la categoría susceptible en el documento M100 del NCCLS.

Otros resultados que podrían ser verificados re-examinando la prueba o repitiendo la prueba.

- *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, o *P. aeruginosa* susceptible a ampicilina, cefazolina o cefalotina
- *Klebsiella* spp., *Providencia* spp. o *Proteus* spp. indol-positivo susceptible a ampicilina

Ciertos resultados podrían ser inusuales en algunas instituciones pero no en otras.

Si la resistencia en una institución específica es común, la repetición de la prueba podría ser innecesaria para verificar aislamientos individuales de pacientes.

Si un resultado es inusual depende de los patrones global y local de resistencia y podría variar de institución en institución o año tras año.

- *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina
- *Enterococcus* spp. de sitios estériles del cuerpo con alto nivel de resistencia a gentamicina
- *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina o cefalosporinas de tercera generación
- *Streptococcus* spp. del grupo viridans intermedia o resistente a penicilina
- *Klebsiella* spp. o *Escherichia coli* con β -lactamasa de espectro extendido
- *Enterobacteriaceae* resistente a ciprofloxacina

Si un aislamiento es resistente a todos los medicamentos relevantes; obtenga lineamientos para probar agentes adicionales.

Políticas de Verificación

Al desarrollar políticas específicas de verificación para resultados que podrían ser inusuales en su contexto, considere:

- Su confianza en el sistema de prueba utilizado
- La competencia de los/as tecnólogos/as en PSA, incluyendo su destreza para reconocer problemas
- La incidencia de resistencia “atípica”
- La población de pacientes (pacientes que reciben terapia antimicrobiana a largo plazo tienden a poseer organismos más resistentes)
- El posible impacto clínico de los resultados (eje., el reporte de MRSA conduce al aislamiento del paciente y a posible terapia con vancomicina)

Verificación – Ejercicio #1

Reporte de Laboratorio

Escherichia coli

Agente antimicrobiano	Susceptibilidad
Amikacina	R
Ampicilina	S
Cefazolina	S
Cefotaxima	S
Ciprofloxacina	S
Gentamicina	R
Tobramicina	R
Trimethoprim-sulfa	S

¿Verificar este aislamiento?

- A. Sí
- B. No

Respuesta:

- A. Sí. Es muy poco común que las *Enterobacteriaceae* sean resistentes a gentamicina, tobramicina y amikacina. Subsecuentemente se mostró que esta prueba estaba contaminada con un *Enterococcus*.

Verificación – Ejercicio #2

Reporte de Laboratorio

Escherichia coli

Agente antimicrobiano	Susceptibilidad
Ampicilina	R
Amoxicilina-ácido clavulánico	S
Cefazolina	S
Cefotaxima	S
Ciprofloxacina	S
Gentamicina	S
Trimeth/sulfa	R

¿Verificar este resultado?

- A. Sí
- B. No

Respuesta:

- B. No. Muchas *E. coli* son resistentes a ampicilina y trimethoprim-sulfamethoxazole.

Verificación – Ejercicio #3

Reporte de Laboratorio

Citrobacter freundii

Agente antimicrobiano	Susceptibilidad
Amikacina	S
Ampicilina	R
Cefazolina	R
Cefotaxima	S
Ciprofloxacina	S
Gentamicina	S
Imipenem	R
Tobramicina	S
Trimeth/Sulfa	S

¿Verificar este resultado?

- A. Sí
- B. No

Respuesta:

- A. Sí. Es muy poco común que las *Enterobacteriaceae* sean resistentes a imipenem. El imipenem es muy lábil a la temperatura, lo cual puede explicar este resultado.

Verificación – Ejercicio #4

Reporte de Laboratorio

Enterobacter cloacae

Agente antimicrobiano	Susceptibilidad
Amikacina	S
Ampicilina	R
Cefazolina	R
Cefotaxima	R
Cefuroxima	R
Ciprofloxacina	S
Gentamicina	S
Piperacilina	R
Tobramicina	S
Trimeth/Sulfa	S

¿Verificar este aislamiento?

- A. Sí
- B. No

Respuesta:

- B. No. *E. cloacae* que produce grandes cantidades de AmpC beta-lactamasa tiene este perfil.

Verificación – Ejercicio #5

Reporte de Laboratorio

Klebsiella pneumoniae

Agente antimicrobiano	Susceptibilidad
Amikacina	S
Ampicilina	R
Cefazolina	S
Cefotaxima	R
Ciprofloxacina	S
Gentamicina	S
Imipenem	S
Tobramicina	S
Trimeth/Sulfa	S

¿Verificar este aislamiento?

- A. Sí
- B. No

Respuesta:

- A. Sí. Sería poco común encontrar que las *Enterobacteriaceae* sean resistentes a cefotaxima (una cefalosporina de 3^{ra} generación) pero susceptible a cefazolina (una cefalosporina de 1^{ra} generación). En raras ocasiones, esto podría ocurrir con cepas productoras de BLEE; sin embargo, el resultado de cefazolina será reportado como resistente.

Verificación – Ejercicio #6

Reporte de Laboratorio

Pseudomonas aeruginosa

Agente antimicrobiano	Susceptibilidad
Amikacina	R
Ceftazidima	R
Ciprofloxacina	R
Gentamicina	R
Piperacilina	R
Tobramicina	R

¿Verificar este aislamiento?

- A. Sí
- B. No

Respuesta:

- A. Sí. Cuando un aislamiento es resistente a todos los agentes reportados rutinariamente, la verificación confirmará las limitadas opciones terapéuticas para tratar infecciones provocadas por el aislamiento. En estos casos, podría resultar útil consultar con un médico (y posiblemente con especialistas en enfermedades infecciosas) para determinar si las pruebas con agentes adicionales podrían ser apropiadas.

Verificación – Ejercicio #7

Reporte de Laboratorio

Enterococcus faecalis

Agente antimicrobiano	Susceptibilidad
Ampicilina	R
Vancomicina	R
Sinergia de gentamicina	R
Sinergia de estreptomycinina	R

¿Verificar este aislamiento?

- A. Sí
- B. No

Respuesta:

- A. Sí. La resistencia a ampicilina es muy poco común en *E. faecalis*, pero se observa frecuentemente en *E. faecium*. La mayoría de ERV son *E. faecium* y es probable que la identificación del aislamiento es incorrecta en este ejemplo.

Verificación – Ejercicio #8

Reporte de Laboratorio

Staphylococcus aureus

Agente antimicrobiano	Susceptibilidad
Clindamicina	S
Eritromicina	S
Gentamicina	S
Oxacilina	R
Penicilina	R
Vancomicina	S

¿Verificar este aislamiento?

- A. Sí
B. No

Respuesta:

- A. Sí. Históricamente, casi todos los MRSA tuvieron resistencia múltiple. Sin embargo, más recientemente, se han recuperado MRSA que no tienen resistencia múltiple con mayor frecuencia de pacientes con infecciones adquiridas en la comunidad. Debido a que este perfil es poco común, éste debe ser verificado.

Verificación – Ejercicio #9

Reporte de Laboratorio

Streptococcus pneumoniae

Agente antimicrobiano	CIM	Susceptibilidad
Cefotaxima	0.5	S
Eritromicina	>1	R
Levofloxacin	≤0.5	S
Penicilina	4	R
Trimeth/Sulfa	>4/76	R
Vancomicina	>1	R

¿Verificar este aislamiento?

- A. Sí
B. No

Respuesta:

- A. Sí. A la fecha, no ha sido reportada resistencia a vancomicina en *S. pneumoniae* y existen criterios de interpretación solo de susceptible para vancomicina y *S. pneumoniae*.

Verificación – Ejercicio #10

Reporte de Laboratorio

Streptococcus pneumoniae

Agente antimicrobiano	CIM	Susceptibilidad
Cefotaxima	≤0,03	S
Eritromicina	≤0,25	S
Levofloxacina	≤0,5	S
Penicilina	≤0,03	S
Trimeth/Sulfa	≤0,5/9,5	S
Vancomicina	≤0,5	S

¿Verificar este aislamiento?

- A. Sí
- B. No

Respuesta:

B. No. Este es un típico perfil para *S. pneumoniae*

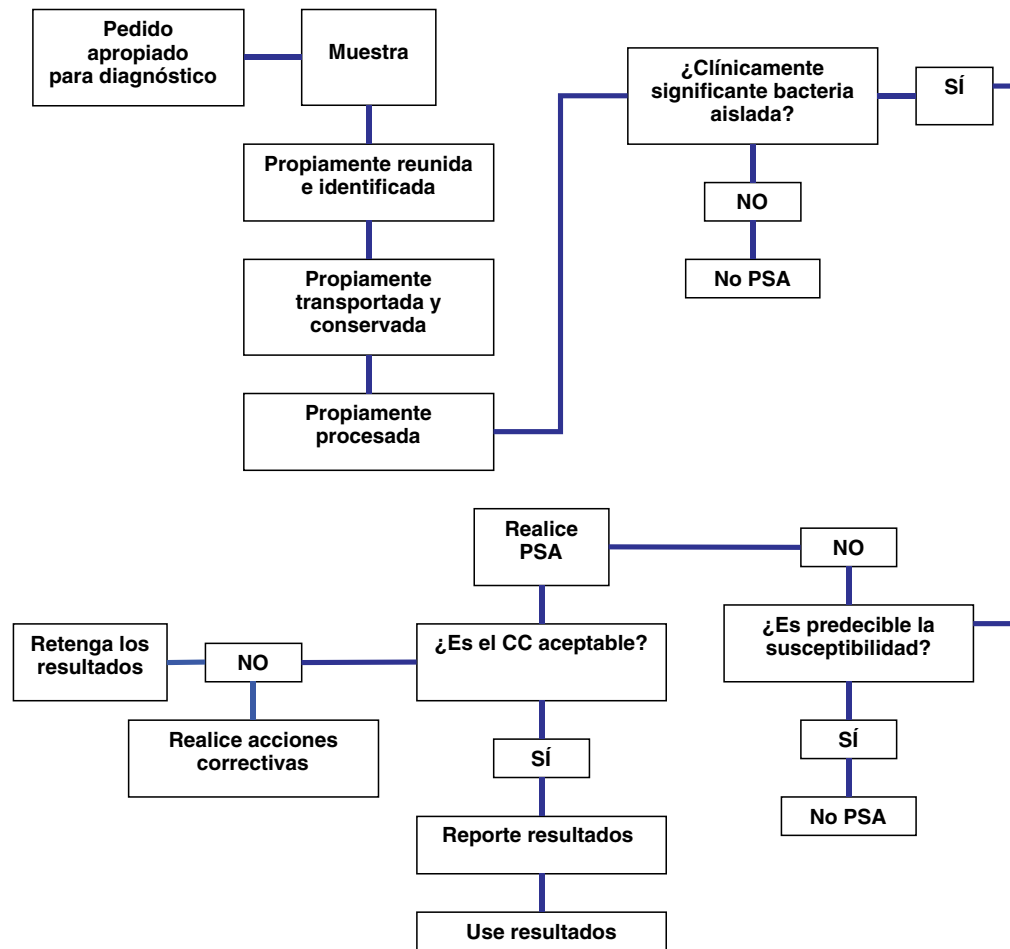


Figura 6.2—Un ejemplo de diagrama de flujo de trabajo para laboratorios

Sistemas de Calidad (SC)

Habiendo revisado varios aspectos del programa de AC para PSA, que incluye el programa de CC, es hora de dar un paso atrás y mirar al enfoque de SC que concibe al programa de AC como parte del flujo de trabajo de todo el laboratorio de microbiología y más allá.

Como se especifica en el documento GP26-A-V del NCCLS, “Campeones del Cambio: Creando un Modelo de Sistema de Calidad,” las cuestiones esenciales de los SC incluyen la organización, el personal, el equipamiento, las adquisiciones/inventarios, el proceso de control, los documentos/registros, el manejo de incidentes, la evaluación interna, el mejoramiento del proceso, el servicio y la satisfacción según estas se relacionan con el flujo de trabajo.

El Flujo de Trabajo en el Laboratorio

El NCCLS recomienda que cada servicio de salud desarrolle un flujograma de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, tal como el que se muestra en la Figura 6.2.

REVISIÓN

El lector/a ahora debe entender los pasos necesarios para asegurar que los resultados reportados en su laboratorio sean precisos y reproducibles.

Recuerde:

- Usar las cepas ATCC de control de calidad recomendadas por el NCCLS para pruebas de CC.
- Revisar los resultados de cada aislamiento antes de reportarlos para garantizar que estos sean consistentes con la identificación del organismo y que los resultados de todos los agentes antimicrobianos probados tengan sentido. Podrían ocurrir errores en las pruebas de aislamientos de pacientes aun cuando los resultados con las cepas de CC sean aceptables.
- Registre cualquier resultado que esté fuera del rango o un problema de AC y documente minuciosamente todas las acciones correctivas que se tomaron.
- Continuamente de seguimiento al proceso de prueba como parte de su programa de aseguramiento de calidad. Además de la precisión en las pruebas y en los reportes, la adecuada selección de las pruebas, la recolección de muestras y, el transporte y el uso adecuado de los resultados de las pruebas son esenciales para optimizar la atención a los pacientes.

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

Debido a que este capítulo sigue el diseño de un cuaderno de trabajo, las preguntas junto con sus respuestas informativas están contenidas a lo largo del texto donde el autor y editor opinan que estas serán más ilustrativas para el lector/a.

7

Sistemas Comerciales

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Discutir la importancia de leer las instrucciones adjuntas en los sistemas comerciales antes de usarlos y en cualquier momento que se publiquen actualizaciones.
- Discutir la importancia de leer literatura adicional que se proporciona con el producto.
- Discutir que significa “limitaciones” para el uso de sistemas comerciales.
- Describir como establecer las medidas apropiadas de control de calidad.
- Discutir una estrategia de verificación cuando un nuevo sistema comercial es introducido en su laboratorio.

ESTUDIO DE CASO

Su laboratorio ha estado usando el método de difusión por disco para pruebas rutinarias de susceptibilidad antimicrobiana por muchos años. Cuando se requieren pruebas de CIM, los aislamientos se envían a un laboratorio de referencia. Ahora el director del laboratorio quiere adquirir un sistema automatizado para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana que daría los resultados de CIM para la mayoría de organismo el mismo día en que se realice la prueba.

Su trabajo es obtener la mayor cantidad de información sobre el sistema de pruebas de CIM para determinar si es o no apropiado para su institución.

¿Cómo abordaría esta tarea? Al completar este capítulo usted estará en capacidad de responder a esta pregunta.

MÉTODOS NCCLS VS. SISTEMAS COMERCIALES DE PRUEBA

Un laboratorio clínico, para analizar aislamientos de pacientes, puede utilizar ya sea:

- Uno de los métodos de referencia del NCCLS (eje. difusión por disco, microdilución en caldo, o dilución en agar) como se describe en los estándares M2 o M7 del NCCLS
- Un sistema comercial de prueba de susceptibilidad antibiótica (AST) aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA)

APROBACIÓN DE LA FDA

La FDA publica “Criterios de Orientación y Revisión para la Evaluación de Dispositivos de Susceptibilidad Antimicrobiana.” Este documento describe la información que los fabricantes deben presentar para obtener “el visto bueno de la FDA” para sus sistemas de prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Usted puede acceder a este documento en <http://www.fda.gov/cdrh/ode/631.html>.

Para que un instrumento o dispositivo de prueba de susceptibilidad antimicrobiana sea aprobado por la FDA, cada agente antimicrobiano incluido en la prueba debe recibir el visto bueno. El fabricante debe demostrar que:

- Los resultados obtenidos con el sistema comercial son comparables a los resultados obtenidos con el método de referencia del NCCLS.
- El desempeño global del sistema comercial cumple con las especificaciones de la FDA.
- Se puede dar seguimiento al desempeño del sistema comercial en forma confiable en el laboratorio clínico siguiendo los procedimientos de control de calidad recomendados por el fabricante.

LAS INSTRUCCIONES ADJUNTAS

Los fabricantes de sistemas comerciales aprobados por la FDA deben incluir instrucciones para usar el sistema con cada producto distribuido. Las instrucciones adjuntas deben contener información específica sobre los siguientes tópicos:

- Uso previsto

Explica el propósito de usar el producto; enfatiza que el desempeño confiable se garantiza sólo cuando el producto es utilizado específicamente para el propósito previsto (eje. pruebas de bacterias específicas).

- Resumen y principios
- Precauciones
- Almacenamiento
- Deterioro del producto

Educa al usuario sobre almacenamiento adecuado, mantenimiento, fecha de expiración y apariencia aceptable del producto y presentación del empaque (eje., si el paquete está roto o es usado después de su fecha de expiración, el producto puede alterarse).

- Recolección y preparación de muestras
- Materiales suministrados
- Materiales requeridos pero no suministrados
- Esquema del procedimiento

Contiene las instrucciones paso a paso para realizar la prueba; enfatiza que cada paso debe seguirse exactamente como se describe.

- Control de calidad

Describe las instrucciones paso a paso para realizar las pruebas de control de calidad requeridas para asegurar que el sistema está funcionando adecuadamente; enfatiza el cumplimiento de las recomendaciones del fabricante incluso cuando estas son diferentes de los protocolos de control de calidad del NCCLS.

- Limitaciones del procedimiento

Describe situaciones específicas que limitan el desempeño confiable del sistema; enfatiza la importancia del uso del producto sólo para el propósito previsto, con el afán de obtener resultados confiables.

- Valores esperados

- Resultados desorientadores

Define situaciones en las cuales los resultados in vitro tiene una pobre correlación con los resultados clínicos.

- Características del desempeño

Enumera los datos generados por diversos estudios realizados por el fabricante durante pruebas exhaustivas; los datos incluyen el porcentaje de concordancia esencial y categórica cuando se comparan con los métodos y resultados de referencia de estudios replicados.

- Capacidad de reproducir la prueba
- Referencias

CONTROL DE CALIDAD

Responsabilidad del Fabricante

El fabricante de cualquier sistema comercial para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana tiene distintas responsabilidades para asegurar la calidad.

El fabricante de asegurarse que:

- La potencia de los agentes antimicrobianos es fiel y estable.
- El agente antimicrobiano en el disco, pozo o tira está adecuadamente identificado y contiene el agente especificado.
- El producto cumple con las regulaciones de buenas prácticas de manufactura.

El fabricante debe:

- Definir las medidas adecuadas de control de calidad que garantizarán que el sistema se desempeñe de acuerdo con las especificaciones y de esta manera produzca resultados precisos.
- Realizar un control de calidad exhaustivo durante el desarrollo y evaluación del producto.
- Entregar los datos de control de calidad junto con una solicitud de aprobación a la FDA.
- Continuar con el control de calidad exhaustivo de cada lote que se fabrique.

Responsabilidad del Usuario

El usuario también tiene responsabilidades para asegurar la calidad.

El usuario debe asegurarse que:

- Los productos sean almacenados conforme a las especificaciones del fabricante.
- Los individuos que realicen las pruebas hayan demostrado competencia en la realización de las pruebas.
- Los individuos que realicen las pruebas sigan las instrucciones de control de calidad del fabricante en forma precisa y fiel.

El usuario debe:

- Probar las cepas de control de calidad recomendadas por el NCCLS y cualesquier cepa adicional seleccionada por el fabricante.
- Realizar todos los procedimientos de control de calidad definidos por el fabricante en las instrucciones adjuntas.

VERIFICACIÓN

De acuerdo con las Enmiendas del Mejoramiento del Laboratorio Clínico de 1988 (CLIA), antes de implementar un nuevo sistema de prueba de susceptibilidad antimicrobiana, el personal de laboratorio debe verificar que el sistema se desempeñe conforme con las especificaciones del fabricante.

La verificación de los productos aprobados por la FDA es un proceso único que debe ser cumplido antes de usar una nueva prueba o la modificación de una existente para el análisis de muestras de pacientes. Esto asegura que los resultados sean precisos y reproducibles.

Puede acceder a las CLIA en <http://www.cms.hhs.gov/clia>

A pesar que las regulaciones de las CLIA no especifican como se debe realizar la verificación de un nuevo sistema de prueba de susceptibilidad antimicrobiana, el proceso debe incluir:

- Revisión de literatura actualizada
- Revisión de información disponible del fabricante
- Conversación con otros que han usado el producto
- Realización de una evaluación limitada en su laboratorio mediante pruebas con aislamientos clínicos y de control

Para una verificación ideal, efectúe una prueba interna paralela del nuevo sistema con un método de referencia del NCCLS, como difusión por disco o microdilución en caldo CIM. Para verificar pruebas de bacterias no exigentes, analice un mínimo de 100-200 aislamientos clínicos frescos escogidos al azar que representen varias especies incluyendo (si están disponibles):

- 5-10 aislamientos de bacterias gram positivas con características de resistencia conocidas
 - Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (ORSA)
 - Estafilococos coagulasa negativos resistentes a oxacilina;
 - Enterococcus faecium* y/o *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina (ERV).

Enterococcus spp. con alto nivel de resistencia a gentamicina y estreptomina.

- 5-10 aislamientos de bacterias gram negativas con características de resistencia conocidas
 - Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. productoras de BLEE
 - E. coli* y *Klebsiella* spp. que no son productoras de BLEEs, pero resistentes a cefalosporinas de espectro extendido
 - Enterobacteriaceae* resistentes a cefalosporinas de 3^{ra} generación, diferentes a *E. coli* y *Klebsiella* spp.
 - Pseudomonas aeruginosa* resistente a ceftazidime y/o cefepime
 - P. aeruginosa* resistente a imipenem
 - Enterobacteriaceae* resistentes a gentamicina y/o tobramicina
 - P. aeruginosa* resistente a gentamicina, tobramicina y amikacina
 - Enterobacteriaceae* resistentes a fluoroquinolonas
 - P. aeruginosa* resistente a fluoroquinolonas

Realice y dé seguimiento al control de calidad diariamente según las recomendaciones del fabricante. Para evaluar la capacidad de reproducir la prueba con las cepas de control de calidad u otras, examine los resultados de 30 series consecutivas.

SISTEMAS COMERCIALES

Manual

Prueba-E o Epsilométrica

La prueba E o método PDM de epsilómetro ha sido usado exitosamente para analizar anaerobios y otros organismos aeróbicos. El término epsilómetro se refiere a una tira fina, de 5 x 50 mm, inerte y no porosa con un gradiente continuo exponencial de agente antimicrobiano inmovilizado en un lado y una escala de interpretación impresa en el otro lado. El gradiente de agente antimicrobiano cubre un amplio rango de concentración, que corresponde aproximadamente diluciones dobles. La pendiente de los cambios y los rangos de concentración están óptimamente diseñados para corresponder a rangos y límites de CIM clínicamente relevantes que son seleccionados para categorizar grupos de susceptibilidad.

Se inocula una placa de agar, que contenga un medio de prueba apto, con un organismo de prueba de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego se aplican las tiras de prueba en un patrón óptimo de tal manera que la máxima concentración en cada tira esté más cerca al borde exterior de la placa de Petri. La placa es inmediatamente incubada aeróbicamente o anaeróbicamente por el periodo de tiempo estipulado.

Cuando es aplicado a una placa de agar inoculada, el gradiente antimicrobiano de la tira es liberado inmediatamente en el agar, creando un gradiente continuo y exponencial de concentraciones de agente antimicrobiano debajo del eje lineal del material de soporte. Después de la incubación, se observa una elipse de inhibición de crecimiento. La intersección entre el borde de la zona de inhibición y la tira de soporte se produce en la concentración del antimicrobiano que ya no es capaz de inhibir el crecimiento. El punto de intersección da la “concentración inhibitoria” (CI) en $\mu\text{g/mL}$ — una medida directa de la susceptibilidad del microorganismo al agente antimicrobiano probado. Las CIMs se leen directamente sobre la escala en la tira de soporte.

Sistemas Automatizados

Vitek

El sistema Vitek es un sistema automatizado, fabricado por bioMérieux, Inc., Hazelwood, MO. Está basado en el principio básico de fotometría. Las bacterias utilizan un sustrato que produce un cambio de color y densidad óptica. Estos cambios son detectados por diodos emisores de luz y detectores fototransistores.

Este sistema está compuesto por un módulo de filtro-sello, una incubadora con lector, un módulo de computadora, una terminal de datos y una impresora. Este sistema es capaz de identificar bacterias gram positivas y gram negativas, anaerobios y levaduras. También realiza pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Es capaz de realizar “Tamizajes” de orina con enumeración e identificación.

El sistema identificará *Enterobacteriaceae* en 4-6 horas y bacilos que no fermentan en 6 a 18 horas.

Sistemas de microbiología automatizada MicroScan

Estos instrumentos están basados en un principio de fotometría-fluorometría. Están disponibles tres sistemas:

TouchSCAN-SR: un lector de panel semiautomatizado con sistema de manejo de datos. El lector leerá el panel manualmente y el sistema proveerá automáticamente una interpretación.

AutoSCAN-4: un lector de panel automatizado con sistema de manejo de datos. El usuario carga el panel y el sistema leerá e interpretará el panel automáticamente.

AutoSCAN- WA: un sistema completamente automatizado con automatización libre de supervisión y sistema de manejo de datos.

Los componentes varían con el sistema, pero cada sistema viene con un sistema computadorizado de manejo de datos con opciones de interfaz a un computador central.

El sistema MicroScan puede procesar paneles congelados o deshidratados. Los paneles cromogénicos convencionales son usados para la identificación de bacterias gram negativas y gram positivas en 18-24 horas. Están disponibles pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para la determinación de CIMs de organismos aeróbicos y anaeróbicos. Paneles cromogénicos rápidos están disponibles para la identificación de *Haemophilus/Neisseria*, levadura y anaeróbicos en 4 horas. Paneles fluorogénicos rápidos también están disponibles para la identificación de bacterias gram negativas y gram positivas en 2 horas, así como para pruebas de susceptibilidad.

REVISIÓN

Ahora usted debe estar informado sobre cuestiones importantes relacionadas con el uso de sistemas comerciales para probar y reportar susceptibilidad antimicrobiana.

Recuerde:

La FDA es responsable de la aprobación de sistemas comerciales de prueba de susceptibilidad antimicrobiana para uso en los Estados Unidos. Sin embargo, para que un sistema comercial obtenga la aprobación de la FDA, el fabricante debe demostrar que los resultados son comparables con aquellos producidos por un método de referencia del NCCLS.

Antes de usar un nuevo sistema comercial en su laboratorio, verifique que los resultados generados sean precisos y reproducibles.

Cuando use cualquier sistema comercial lea minuciosamente las instrucciones adjuntas y siga las instrucciones del fabricante en forma precisa.

Tenga cuidado con las limitaciones descritas en las instrucciones adjuntas del sistema comercial.

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

1. ¿Cuál documento del NCCLS contiene información sobre sistemas comerciales de prueba para susceptibilidad antimicrobiana?
 - A. M2
 - B. M7
 - C. M100
 - D. Ninguno de los anteriores
2. Basándose en los documentos M2 y M7 del NCCLS, ¿Cuál de los siguientes NO se consideraría un método de referencia?
 - A. Difusión por disco
 - B. Microdilución en caldo

- C. Dilución en agar
 - D. Prueba-E o Epsilométrico
3. Usted está usando un sistema comercial que tiene una limitación para analizar *Burkholderia cepacia*. ¿Cómo analizaría esta especie?
- A. Analizar el aislamiento usando el sistema comercial y calificar a los resultados con el comentario que “Los resultados son presuntivos.”
 - B. Analizar el aislamiento usando el sistema comercial y reportar los resultados si son típicos para *B. cepacia*.
 - C. Usar un sistema alternativo de CIM para analizar el aislamiento.
4. ¿Cuál de los siguientes usted debería considerar cuando seleccione aislamientos para pruebas internas paralelas de un nuevo sistema comercial de prueba para susceptibilidad antimicrobiana? Seleccione todas las opciones que apliquen.
- A. Incluir aislamientos que tienen clínicamente resistencia significativa.
 - B. Incluir aislamientos que representan los tipos de especie encontrados en su institución.
 - C. Incluir igual número de cada especie.
 - D. Incluir aislamientos, siempre que sea posible, que tengan CIMs con escala adjunta.
5. Para determinar si el sistema comercial de CIM propuesto es apropiado para su institución, ¿Qué información recolectaría para el director de su laboratorio? Seleccione todas las opciones que apliquen.
- A. Artículos publicados
 - B. Información del fabricante
 - C. Información de otros usuarios
 - D. Publicaciones del NCCLS
6. El director de su laboratorio está contento con la información que usted recopiló y le pide que haga una verificación interna del desempeño del sistema comercial. ¿Cómo lo haría?
- A. Probar solo las cepas de control de calidad recomendadas por 30 días consecutivos de prueba.
 - B. Probar 200 aislamientos clínicos con el nuevo sistema en paralelo con el método de referencia.
 - C. Probar las cepas de control de calidad recomendadas por 30 días consecutivos de prueba y probar 20-30 aislamientos clínicos seleccionados al azar.
 - D. Probar las cepas de control de calidad recomendadas por 30 días consecutivos de prueba y probar 150-200 aislamientos clínicos seleccionados al azar y aislamientos con características de resistencia seleccionadas.
7. Datos de un estudio interno de verificación muestran que la mayor tasa de error para oxacilina y *S. aureus* es 10% (1 de cada 10 aislamientos es falsamente susceptible). ¿Qué haría? Seleccione todas las opciones que apliquen.
- A. Examinar detenidamente todos los datos de desempeño, internos y publicados, para oxacilina y *S. aureus*.
 - B. Analizar otra vez el aislamiento implicado.
 - C. Analizar ORSA adicionales.
 - D. Descartar los datos puesto que era sólo un aislamiento.
8. ¿Quién es el responsable de la aprobación de sistemas comerciales de prueba para susceptibilidad antimicrobiana para uso en los Estados Unidos?

9. ¿Cómo demostraría el fabricante que los resultados son comparables a aquellos producidos por un método de referencia del NCCLS?
10. Antes de usar el sistema, ¿Cuál es la responsabilidad del laboratorio?
11. ¿Qué son las instrucciones adjuntas? ¿Por qué deben leerse minuciosamente antes de poner en práctica el sistema?
12. ¿Qué significa “limitaciones del procedimiento” según se describen en las instrucciones adjuntas?
13. ¿Cuál de los métodos AST no sería considerado método de referencia, tomando como base lo que consta en los M2 y M7 del NCCLS?
14. ¿Cuál es el principio del procedimiento de la prueba-E o Epsilométrica?

III

Organismos Gram Positivos

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Analizar los mecanismos de resistencia a la penicilina, oxacilina, eritromicina, clindamicina y vancomicina en las especies de *Estafilococos*
- Escoger los agentes antimicrobianos apropiados contra las especies de *Estafilococos* para realizar las pruebas de rutina y los respectivos reportes
- Mencionar tres métodos de prueba que pueden ser usados para detectar resistencia a la oxacilina en las especies de *Estafilococos*
- Comparar y diferenciar los *Staphylococcus aureus* con resistencia verdadera (ORSA) a la oxacilina con los *S. aureus* con resistencia “borderline” a la oxacilina (BORSA)
- Usar los resultados de las pruebas de oxacilina y penicilina para predecir la susceptibilidad a otros agentes beta-lactámicos con estafilococos
- Describir métodos confiables para detectar *S. aureus* vancomicina-intermedio (VISA)

ANTECEDENTES

S. aureus es un patógeno importante para el ser humano ya que puede causar una gran variedad de infecciones tanto en individuos sanos como en inmunodeficientes. También puede colonizar la piel y las fosas nasales facilitando su transmisión en particular en ambientes hospitalarios a menos que se sigan prácticas apropiadas de control de infecciones. La resistencia a los antibióticos comúnmente usados está aumentando a nivel mundial. Más del 90% de *S. aureus* presentan resistencia a la penicilina. En muestras aisladas de las unidades de cuidado intensivo en los Estados Unidos se encontró más del 50% de resistencia a oxacilina. En forma creciente también se ha observado resistencia a oxacilina en *S. aureus* aislados en la comunidad. Con frecuencia se prescribe vancomicina para tratar infecciones provocadas por *S. aureus* con resistencia múltiple. Sin embargo, se han reportado casos de disminución de la susceptibilidad a vancomicina en varios países incluyendo los Estados Unidos. En el 2002 se aisló la primera cepa totalmente resistente a vancomicina (CIM = 1024 µg/mL) en un paciente de diálisis en Michigan. Esta bacteria poseía el gene de resistencia a la vancomicina *vanA*. Dos cepas adicionales se han aislado de manera subsecuente en Pennsylvania y New York.

Los estafilococos coagulasa negativa (CoNS) son habitantes comunes de la piel y el tracto urinario. Su aislamiento en los cultivos por lo general indica contaminación. De todas maneras estos pueden ser patógenos significativos en pacientes inmuno deficientes y en aquellos con catéteres intravenosos y dispositivos médicos.

A pesar de que hay muchas especies de CoNS el que se aísla con más frecuencia en muestras clínicas es *S. epidermidis*. *S. saprophyticus* es una causa importante de infecciones urinarias agudas no complicadas. Los CoNS aislados son típicamente más resistentes que *S. aureus* a agentes antimicrobianos con una prevalencia de resistencia a los beta-lactámicos que llega al 60-70%. Por ende, la vancomicina se usa con frecuencia para tratar las infecciones por CoNS.

CASO DE ESTUDIO

Un hombre de 35 años de edad ingresó al hospital por una herida de bala en el abdomen. Cinco días después de la operación desarrolló una infección en la herida. El material purulento de la herida produjo un cultivo puro de *S. aureus*. Dos días después, se emitió el informe final del cultivo y las probas de susceptibilidad antimicrobiana. Sólo era sensible a vancomicina. Luego de recibir el resultado, el médico llamó al laboratorio para pedir que se probara frente a agentes adicionales debido a que el paciente tenía una historia de reacciones adversas a la vancomicina. Se habían probado varios agentes más pero no se informó al respecto porque el laboratorio tiene un protocolo de informes selectivos. El informe interno del laboratorio que se muestra a continuación presenta los resultados de todos los agentes antimicrobianos probados.

Ciprofloxacina	R
Clindamicina	R
Eritromicina	R
Gentamicina	S
Linezolida	S
Oxacilina	R
Penicilina	R
Tetraciclina	R
Trimethoprim/sulfamethoxazole	S
Vancomicina	S

Después de completar este capítulo el lector sabrá como responder al médico.

RESISTANCIA ANTIMICROBIANA

S. aureus Resistente a la Penicilina

En 1944, dos años después de la introducción de la penicilina, se reportó el primer *S. aureus* resistente a la penicilina. Se encontró que éste produjo una enzima penicilinasas (un tipo de β -lactamasa) que hidrolizó el anillo beta-lactámico de la penicilina. Como se mencionó antes, en la actualidad, en muchas regiones geográficas la resistencia a la penicilina debida a la producción de beta-lactamasa excede el 90%.

S. aureus Resistente a la Oxacilina (ORSA)

La oxacilina y la metilicina son penicilinas semisintéticas que son estables a la β -lactamasa estafilocócica gracias a la ubicación estratégica de ciertas cadenas laterales en la molécula. Estos antibióticos fueron desarrollados específicamente para el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus* productores de beta-lactamasa.

Sin embargo, la resistencia a antibióticos del tipo meticilina pronto apareció por la emergencia del gene *mecA*. Este gene codifica para una nueva proteína PBP2a que se une a la penicilina. Esta proteína participa en la síntesis de la pared celular a pesar de la presencia de antibióticos tipo meticilina. Inicialmente, los primeros aislamientos se denominaron *S. aureus* resistente a la meticilina o MRSA, empero estas se denominan más apropiadamente *S. aureus* resistente a la oxacilina u ORSA puesto que es la oxacilina el antibiótico que generalmente se usa en las pruebas de laboratorio. Los ORSA se consideran resistentes a todas las penicilinas penicilinasas estables tales como oxacilina, meticilina, nafcilina, cloxacilina, y dicloxacilina. Además, todos los ORSA son resistentes a todos los demás agentes beta-lactámicos. Los ORSA usualmente son resistentes a múltiples clases de agentes entre los que se incluyen macrólidos, lincosamidas, y tetraciclinas. También pueden ser resistentes a las fluoroquinolonas y aminoglucósidos.

Los ORSA pueden demostrar resistencia homogénea o heterogénea a la oxacilina. En las cepas homogéneamente resistentes, todas las cepas hijas tienen *mecA* y son resistentes a la oxacilina. En las cepas heterogéneamente resistentes, toda la población tiene *mecA* pero muchas células no expresan resistencia a la oxacilina.

Resistencia “Borderline” a la Oxacilina

Con poca frecuencia el *S. aureus* tiene CIMs de oxacilina que se encuentran cerca del límite de interpretación de resistencia y se conocen como BORSA por sus siglas en inglés que significan *S. aureus* con resistencia “borderline” a la oxacilina. Al contrario de las ORSA estas cepas pueden ser tratadas mediante combinaciones de beta-lactámicos e inhibidores de beta-lactamasa. Éstas no portan el gene *mecA*, usualmente no tienen resistencia múltiple, ni tampoco crecen en oxacilina-agar salino. La BORSA puede ocurrir por uno de varios mecanismos. Algunas cepas son hiperproductoras de β -lactamasa que inactiva parcialmente a la oxacilina y otros beta-lactámicos. En otras cepas, raras, hay una modificación de PBP 1, 2 y 4 que no ligan la oxacilina de manera eficiente. Por último, algunas cepas con MICs cercanos al límite de susceptibilidad en realidad son productoras de *mecA* heteroresistente y generalmente no se les denomina BORSA.

Resistencia MLS

La resistencia a los macrólidos como la eritromicina y las lincosamidas como la clindamicina por lo general se debe a la presencia del gene *erm*. Estos genes *erm* poseen el código para la producción de una enzima ARN metilasa que modifica la zona ribosómica de unión de los macrólidos, lincosamidas y las estreptograminas B. Las cepas que poseen *ermA*, *ermB* o *ermC* típicamente son resistentes a la eritromicina, pero aparecen inicialmente como sensibles a la clindamicina (especialmente las cepas *ermC*). En aquellos aislamientos la resistencia a la clindamicina aparece después de la inducción con eritromicina.

Resistencia mediada por *msrA*

Un segundo mecanismo de resistencia a la eritromicina es mediado por el gene *msrA*. Este gene codifica para la producción de una bomba de eflujo que expulsa la eritromicina fuera de la célula. Las cepas *msrA* son susceptibles a clindamicina pero son resistentes a eritromicina.

Resistencia a Vancomicina

***S. aureus* vancomicina-intermedio (VISA)**

Recientemente se han descrito cepas con reducida susceptibilidad a la vancomicina (CIMs 8-16 µg/mL) y completamente resistentes (CIMs ≥32 µg/mL). Las primeras cepas se denominan *S. aureus* vancomicina-intermedio (VISA) o *S. aureus* glicopéptido-intermedio (GISA). El mecanismo de reducida susceptibilidad a la vancomicina no está claro pero en parte se debe a un engrosamiento de la pared celular que contiene precursores capaces de ligar la vancomicina extracelularmente. Examine la fotografía de una micrografía electrónica de células VISA. La mayoría de VISAs son ORSA que contienen *mecA*. La mayoría de VISAs se han detectado en pacientes con una historia de uso de vancomicina e infección por ORSA. Menos de 50 casos clínicos de infección por VISA se han reportado en todo el mundo. Sin embargo, se han reportado docenas de cepas con MICs de 4 µg/mL que es el límite superior de susceptibilidad. Estas cepas deben ser consideradas potencialmente como VISA y se recomienda repetir la prueba.

Resistencia Completa a Vancomicina

Las cepas *S. aureus* con resistencia completa a la vancomicina se denominan VRSA. Como se mencionó antes éstas son extremadamente raras. Solo tres cepas se han detectado hasta mediados de 2004.

Resistencia en CoNS

La resistencia antimicrobiana en CoNS es similar a la que se observa en *S. aureus*, aunque estas son generalmente más resistentes. Como en *S. aureus*, la mayoría de la resistencia a oxacilina se debe a la presencia de *mecA*. Una susceptibilidad reducida a la vancomicina es más frecuente en *S. haemolyticus* y *S. epidermidis* que en *S. aureus*.

MÉTODOS

Consultar Cuadro 1 y Glosario I en el NCCLS M-100 para orientación sobre la selección de agentes antimicrobianos para pruebas de sensibilidad de estafilococos.

Prueba de Difusión por disco

El método de difusión por disco puede ser utilizado para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de estafilococos con ciertas modificaciones. El inóculo debe prepararse usando el método de suspensión directa de colonias. Este método se prefiere a los caldos de cultivo porque crecen lentamente, y subpoblaciones heteroresistentes pueden ser opacadas por células susceptibles que crecen más rápidamente. Por las mismas razones, éste debe completar 24 horas de incubación antes de determinar la susceptibilidad a oxacilina. Por último, las zonas de inhibición de oxacilina deben medirse con luz transmitida en vez de reflejada. El uso de luz transmitida permite una mejor detección de ORSA heteroresistente ya que éstas subpoblaciones podrían ser visibles solo como una ligera patina en el crecimiento. ORSA homogéneos presentan un crecimiento que confluye alrededor del disco de oxacilina.

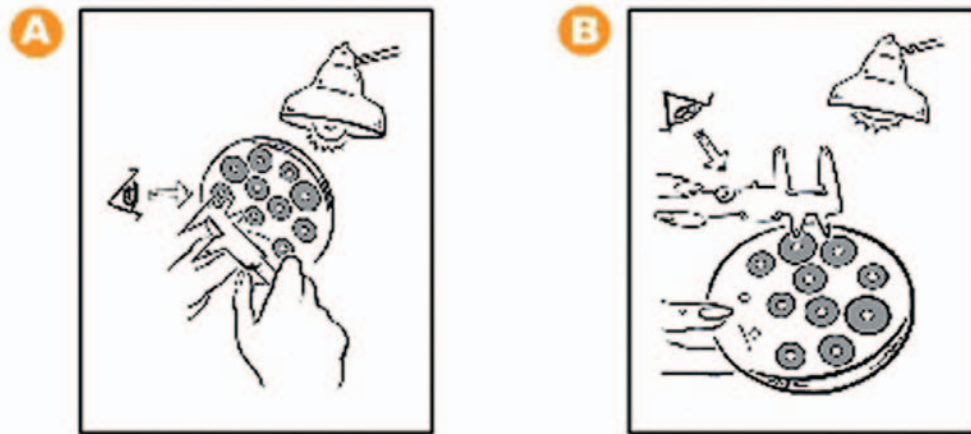


Figura 8.1.—A & B: Luz transmitida (A) vs. luz reflejada (B).

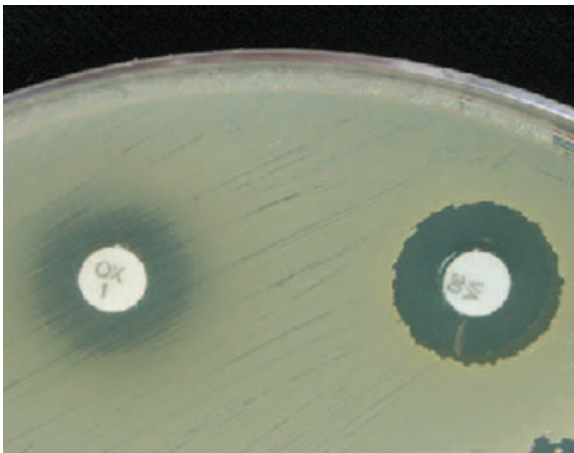


Figura 8.2.—Una ligera patina alrededor del disco de oxacilina indica heteroresistencia.

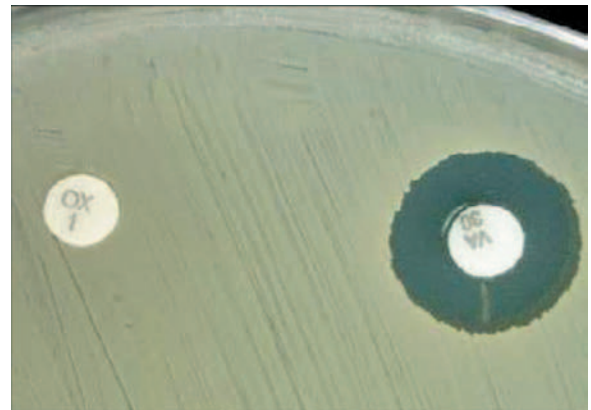


Figura 8.3.—Gran crecimiento que confluye alrededor del disco de oxacilina refleja resistencia homogénea.

Criterios de Interpretación de Oxacilina :

Como se puede ver en el cuadro siguiente, los criterios de interpretación de oxacilina para *S. aureus* son diferentes de los utilizados para CoNS. Para resistencia de *S. aureus* a oxacilina, una zona de inhibición ≥ 13 mm es susceptible, y ≤ 10 mm es resistente. El mismo método de difusión por disco es utilizado para todos los *Staphylococcus* spp. Pero los criterios de interpretación para CoNS son mayores, así una zona ≥ 18 mm es susceptible y ≤ 17 mm es resistente.

Criterios de Interpretación para Difusión de Disco de Oxacilina (mm)

Organismo	Susceptible	Intermedia	Resistente
<i>S. aureus</i>	≥13	11–12	≤10
CoNS	≥18		≤17

Uso de la Prueba de Disco de Cefoxitina para Predecir Resistencia a Oxacilina

Recientemente el NCCLS ha recomendado el uso de límites alternativos en la prueba de susceptibilidad de disco de cefoxitina como un método más preciso para predecir la resistencia a oxacilina mediada por *mec-A* en estafilococos. El método estándar de difusión por disco de cefoxitina de 30 µg se usa con los siguientes límites de interpretación:

Criterios de Interpretación de Disco de Cefoxitina para Susceptibilidad a Oxacilina

Organismo	Diámetro de la Zona de Disco de Cefoxitina (mm)	
	Susceptible a Oxacilina	Resistente a Oxacilina
<i>S. aureus</i>	≥ 20	≤ 19
CoNS	≥ 25	≤ 24

Aislamientos de estafilococos con diámetros de la zona de cefoxitina mayores o iguales al límite apropiado deben reportarse como susceptible a oxacilina, en cambio aislamientos con diámetros menores o iguales al límite apropiado deben reportarse como resistentes a oxacilina.

Prueba de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de Microdilución en Caldo

El método de microdilución en caldo puede ser utilizado para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de estafilococos con ciertas modificaciones. El inóculo debe prepararse usando el método de suspensión directa de colonias. Además, se debe usar como medio para la prueba de oxacilina el caldo de Mueller-Hinton con ajuste de cationes más NaCl al 2%. Por último, se debe completar 24 horas de incubación antes de determinar la susceptibilidad a oxacilina y vancomicina. Los criterios de interpretación de oxacilina para *S. aureus* son diferentes de los utilizados para CoNS. Para resistencia de *S. aureus* a oxacilina, una CIM de ≤2,0 µg/mL es susceptible, y ≥4 µg/mL es resistente. Para CoNS una CIM de oxacilina de ≤0,25 µg/mL es susceptible, y ≥0,5 µg/mL es resistente.

Criterios de Interpretación para CIM de Oxacilina (µg/mL)

Organismo	Susceptible	Resistente
<i>S. aureus</i>	≤ 2,0	≥ 4,0
CoNS	≤ 0,25	≥ 0,5

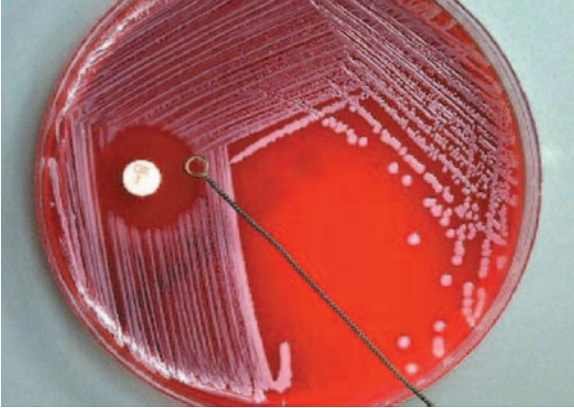


Figura 8.4—Seleccionando cepas que han sido inducidas para producción de beta-lactamasa.

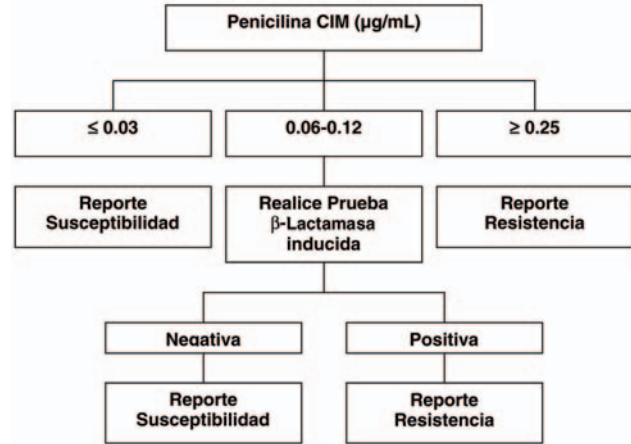


Figura 8.5—Estrategia para probar estafilococos con CIMs de penicilina intermedios.

Para aislamientos de estafilococos que producen CIMs intermedios de penicilina de 0,06-0,12 $\mu\text{g/mL}$, la susceptibilidad debe ser confirmada después de la inducción con oxacilina. Algunas de estas cepas podrían producir pequeñas cantidades de beta-lactamasa que pueden afectar la respuesta del paciente a la terapia. La inducción puede hacerse inoculando el aislamiento en agar sangre y agregando un disco de oxacilina. No es necesario utilizar una suspensión estandarizada para la inoculación. Luego de la incubación durante toda la noche, se debe seleccionar el crecimiento de la periferia de la zona de inhibición para una prueba convencional de beta-lactamasa. Si el resultado es positivo el aislamiento se reporta como resistente a penicilina.

Los criterios de interpretación desarrollados por NCCLS para pruebas de resistencia a oxacilina en CoNS se basaron en la presencia de *mecA* en cepas resistentes. Los límites se aplican a todos los CoNS a pesar de que funcionan mejor con *S. epidermidis*. Para infecciones severas causadas por otros CoNS con CIMs de oxacilina de 0,5-2 $\mu\text{g/mL}$ podrían ser apropiadas pruebas adicionales para *mecA* o PBP2a. Cepas que son *mecA* negativas o que no producen PBP2a deben reportarse como susceptibles a oxacilina.

Ocasionalmente, aislamientos *mecA* de *S. aureus* tienen una CIM a oxacilina de 4 $\mu\text{g/mL}$ que es el límite de resistencia. Estas cepas heteroresistentes deben ser diferenciadas de las cepas *mecA* negativas que tienen CIM con resultados “borderline” debido a un mecanismo diferente de resistencia. Ver el algoritmo en la Figura 8.6. Después de confirmar que el cultivo es puro y que la identificación es correcta el aislamiento debe ser analizado con un método rápido para *mecA* o PBP2a. Si cualquiera de estas pruebas es positiva, la CIM debe repetirse. Si la CIM es ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$, la cepa debe reportarse como susceptible a oxacilina. Si la CIM es ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$, la cepa debe reportarse como resistente con un mecanismo inusual de resistencia.

Prueba de Resistencia Inducible a Clindamicina

Como se mencionó anteriormente, los estafilococos pueden ser resistentes a la eritromicina ya sea por intermedio de genes *erm* o *msrA*. Las cepas con resistencia a eritromicina mediada por *erm* podrían tener resistencia inducible a clindamicina y podrían aparecer susceptibles a clindamicina en la prueba de difusión con disco.

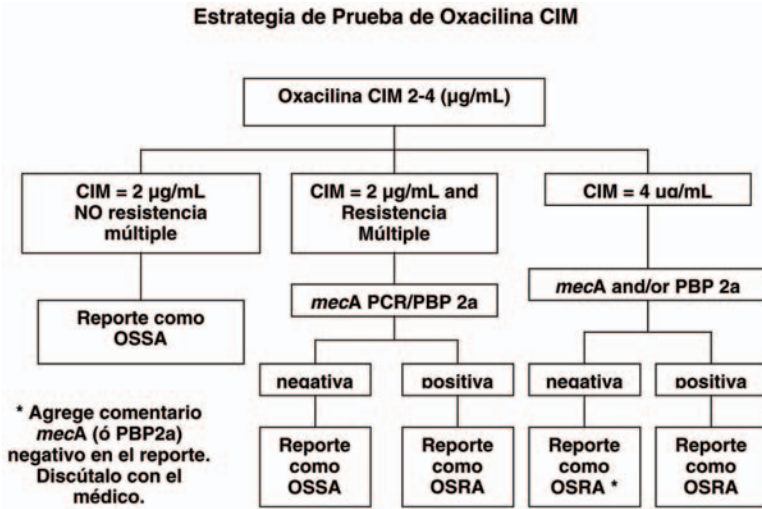


Figura 8.6—Estrategia para probar aislamientos con oxacilina CIM 2 a 4 µg/mL.

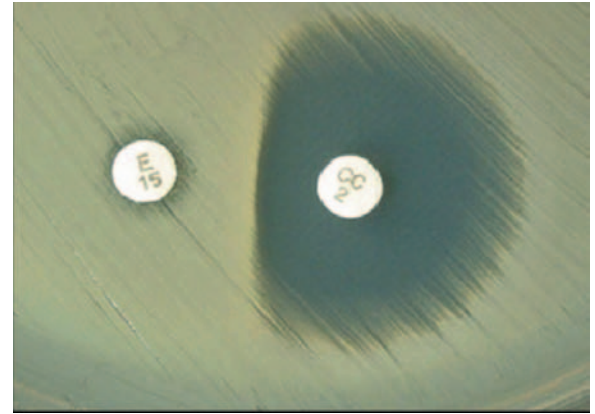


Figura 8.7—Achatamiento de la zona clindamicina debido a una resistencia inducible.

Tales cepas deben ser analizadas para determinar este atributo poniendo discos de eritromicina y clindamicina con una separación de 20 mm en un medio MHA inoculado con la cepa en cuestión. Luego de la incubación durante toda la noche, se debe buscar una zona achatada en forma de “D” de inhibición de clindamicina. Si la zona no es achatada el aislamiento debe reportarse como susceptible. Si la zona es achatada el aislamiento debe reportarse ya sea como resistente o como susceptible con la advertencia que durante la terapia con clindamicina podría desarrollarse resistencia.

Resumen de los perfiles de eritromicina y clindamicina en *S. aureus*

Eritromicina	Clindamicina	Determinante Genético	Fenotipo Inducible o constitutivo Clindamicina-R?
S	S	–	No
R	R	<i>ermB</i>	No, yaR
R	S	<i>ermC</i>	Si
R	S	<i>msrA</i>	No

Detección VISA/VRSA

La referencia del NCCLS para microdilución en caldo es confiable para la detección de VISA (CIM de vancomicina 8-16 µg/mL) y VRSA (CIM de vancomicina > 16µg/mL). El método epsilométrico (E-test) también tiene buen desempeño en la detección de estos organismos. La difusión por disco y algunos métodos comerciales automatizados no son confiables para la detección de VISA y VRSA. Si se usan estos métodos, deben realizarse pruebas complementarias utilizando crecimiento en agar BHI-vancomicina (6 µg/mL) por lo menos en las cepas ORSA. Para las cepas que crecen en este medio o si el paciente no responde a la terapia con vancomicina, se debe realizar una CIM de vancomicina. Los VISA crecen más lentamente que el típico *S. aureus* y puede tomar dos días para que desarrollen colonias visibles. La morfología de las colonias es variable en el mismo cultivo con grandes colonias entre blanco y crema, y pequeñas colonias grises. En caso de sospecha de VISA, (CIM 4-16 µg/mL) se debe repetir la identificación y la prueba de susceptibilidad. Además, se debe tomar contacto con el departamento de control

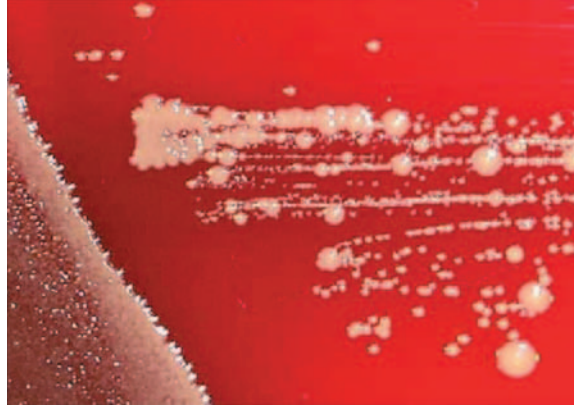


Figura 8.8—Morfología variable de las colonias por VISA, después de 48 horas de incubación.

de infecciones de la institución, el departamento local de salud, así como el CDC (SEARCH@cdc.gov). El aislamiento debe ser enviado al CDC para confirmación de la identificación y los resultados de susceptibilidad a vancomicina. Por último, el aislamiento debe conservarse.

Los criterios del CDC para confirmación de VISA son:

- Microdilución en caldo de vancomicina CIM = 8-16 $\mu\text{g/mL}$
- E-test de vancomicina CIM = 6-16 $\mu\text{g/mL}$
- Crecimiento en agar BHI-vancomicina (6 $\mu\text{g/mL}$) en 24 horas

Como con *S. aureus*, la difusión por disco y algunos sistemas comerciales no han sido confiables para la detección de CoNS con reducida susceptibilidad a vancomicina. Las especies que con mayor frecuencia presentan reducida susceptibilidad a vancomicina incluyen *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*. La respuesta clínica podría ser escasa en algunos pacientes infectados con especies de CoNS que poseen una reducida susceptibilidad a vancomicina. Por lo tanto, si los CoNS de áreas del cuerpo normalmente estériles tienen una respuesta a vancomicina con CIMs ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$, podría ser útil hacer una identificación de especies.

Prueba CIM de Dilución en Agar para Todos los Agentes

Cuando se analicen estafilococos utilizando el método CIM de dilución en agar se debe usar el método de suspensión directa de colonias para la preparación del inóculo y el periodo de incubación debe durar 24 horas. Para la prueba de oxacilina el medio de prueba debe ser el agar Mueller-Hinton (MHA) complementado con NaCl al 2%.

Prueba de detección “Screening” para *S. aureus* en Oxacilina Agar-Sal

La prueba de detección “screening” para oxacilina en agar-sal es útil para identificar ORSA o para definitivamente confirmar resultados de oxacilina que resultan equivocados con otros métodos. No es confiable para CoNS. Debe ser inoculado utilizando el método de suspensión directa de colonias que alcance 0,5 del estándar de McFarland. Debe ser inoculado en máculas con un asa calibrada de 1 μL o con

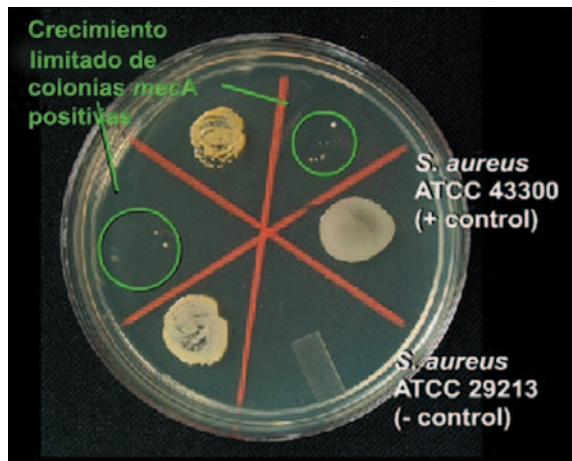


Figura 8.9—Oxacilina agar salado para detectar cepas positivas *mec A*.

un aplicador embebido en la suspensión del inóculo y diseminado en un área de aproximadamente 18 mm de diámetro. Luego el cultivo debe ser incubado por 24 horas. La aparición de > 1 colonia o película de crecimiento (incluyendo una ligera película) indica resistencia a oxacilina. El control de calidad se realiza utilizando *S. aureus* ATCC 29213 (susceptible) y *S. aureus* ATCC 43300 (resistente). Aunque esta prueba es conocida como detección “screening” los resultados pueden ser considerados definitivos para evaluar la resistencia a oxacilina en *S. aureus*.

Prueba Molecular para el Gene *mecA* o su Producto, PBP2a

La prueba molecular para el gene *mecA* o su producto, PBP2a, puede también realizarse para determinar el fenotipo resistente a oxacilina. Las pruebas moleculares para el *mecA* incluyen un ensayo de reacción cíclica (disponible como un “kit” aprobado por la FDA) y una reacción en cadena de polimerasa (PCR) que se realiza en el laboratorio. La PBP2a puede detectarse mediante una prueba de aglutinación de látex que está disponible comercialmente.

REPORTE DE RESULTADOS – BETA-LACTÁMICOS

Los resultados de las pruebas de oxacilina y penicilina se pueden utilizar para predecir la susceptibilidad a otros antibióticos beta-lactámicos. Por lo tanto, la penicilina y la oxacilina son los únicos beta-lactámicos que necesitan ser probados. Si una cierta cepa es susceptible a ambos antibióticos, es también susceptible a otras penicilinas, además de cefemes y carbapenemes. Si es resistente a penicilina pero susceptible a oxacilina, es resistente a penicilinas lábiles a beta-lactamasa pero susceptible a penicilinas estables a beta-lactamasa, y a combinaciones de inhibidores de beta-lactámicos/beta-lactamasa así como a cefemes y carbapenemes. Si la cepa es resistente tanto a penicilina como a oxacilina, es resistente a todos los beta-lactámicos.

Los resultados con otros antibióticos beta-lactámicos podrían reportarse al médico en forma de comentario. Por ejemplo, si una cepa es susceptible a oxacilina pero resistente a penicilina, el comentario podría decir “cefazolina y otros beta-lactámicos (excepto amoxicilina, ampicilina, y penicilinas) son activos para estafilococos resistentes a penicilina y susceptibles a oxacilina.” Los estafilococos resistentes a oxacilina, al margen de los resultados de susceptibilidad *in vitro*, deben reportarse como resistentes a todos los beta-lactámicos, incluyendo carbapenemes y combinaciones de inhibidores de beta-lactámicos/beta-lactamasa.

S. saprophyticus

S. saprophyticus es un CoNS que causa infecciones del tracto urinario. Estas infecciones usualmente son tratadas exitosamente con agentes antimicrobianos comunes para el tracto urinario. Un comentario al respecto puede añadirse al informe. A pesar que CIMs de oxacilina en *S. saprophyticus* típicamente varían entre 0.5-2.0 µg/mL (en la categoría resistente) esta especie usualmente carece del gene *mecA*. Por ende no están recomendadas las pruebas de susceptibilidad para aislamientos del tracto urinario.

CONTROL DE CALIDAD

Para instrucciones específicas sobre control de calidad de las pruebas de estafilococos consultar el Capítulo 6 de este manual. Las cepas de control de calidad recomendadas por NCCLS son:

- Difusión por disco – *S. aureus* ATCC 25923 (cepa susceptible a penicilina)
- Pruebas CIM– *S. aureus* ATCC 29213 (resistente a penicilina, cepa beta-lactamasa positiva)
- “Screening” oxacilina agar-sal - *S. aureus* ATCC 29213 (susceptible a oxacilina) y *S. aureus* ATCC 43300 (resistente a oxacilina)

COMENTARIO DE EL ESTUDIO DE CASO

Revise el Estudio de Caso en la Introducción de este capítulo y las susceptibilidades a los antibióticos que se presentan a continuación. Ahora debe ser capaz de explicar el fundamento de su protocolo de reportes de rutina y proveer resultados complementarios apropiados conforme a la solicitud del médico. Recuerde que la vancomicina no es apropiada para este paciente.

Resultados Reportados

Fuente de la muestra: Herida

Resultados: *Staphylococcus aureus*

Clindamicina	R
Eritromicina	R
Oxacilina	R
Penicilina	R
Vancomicina	S

Resultados de todos los antibióticos probados

Fuente de la muestra: Herida

Resultados: Muchos *Staphylococcus aureus*

Ciprofloxacina	R
Clindamicina	R
Eritromicina	R
Gentamicina	S
Linezolida	S
Oxacilina	R
Penicilina	R
Tetraciclina	R
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	S
Vancomicina	S

Una respuesta apropiada para el médico sería una explicación del fundamento de (o argumentos en contra) las pruebas y resultados complementarios de agentes antimicrobianos para tratar los ORSA del paciente.

- Gentamicina. A pesar que el aislamiento es susceptible a gentamicina, este antibiótico no es reportado en forma rutinaria porque los aminoglucósidos no se consideran agentes de primera línea contra estafilococos. Estos se utilizan, a veces, en combinación con un agente activo de pared celular (eje. vancomicina) para tratar infecciones estafilocócicas severas.
- Fluoroquinolonas. El aislamiento del paciente es resistente a ciprofloxacina que es una fluoroquinolona. Esto no es inusual en ORSA. Los estafilococos que son resistentes a una fluoroquinolona son típicamente resistentes a otras fluoroquinolonas.
- Trimethoprim/sulfamethoxazole. El aislamiento es susceptible a este antibiótico. Algunos laboratorios reportan rutinariamente trimethoprim/sulfamethoxazole en ORSA a pesar que no se considera un agente de primera línea en la mayoría de infecciones por ORSA.
- Otros beta-lactámicos aparte de oxacilina. Este aislamiento es un ORSA y por tanto es resistente a todos los beta-lactámicos.
- Tetraciclinas. El aislamiento es resistente a tetraciclina. Sin embargo, es posible que otras tetraciclinas (eje. doxiciclina, minociclina) sean más activas que la tetraciclina contra los estafilococos y ameritarían pruebas adicionales si su uso se considera una opción de tratamiento tomando como base la condición del paciente.
- Linezolida. El nuevo agente oxazolidinona, linezolida, no forma parte del panel de rutina del laboratorio para estafilococos, pero se está usando linezolida para tratar algunos tipos de infección por ORSA. A pesar que la resistencia entre los estafilococos es muy poco común, la linezolida debe ser probada si se considera una terapia con linezolida.
- Otros. El cloramfenicol, quinupristina-dalfopristina, y rifampicina no están en el panel de rutina del laboratorio para estafilococo, sin embargo, si alguno de estos se considera para tratamiento, estos deben ser analizados.
- Otros macrólidos aparte de eritromicina. Debido a que el aislamiento es resistente a eritromicina, puede ser considerado resistente a azitromicina y claritromicina. Estos tres antibióticos constan en conjunto en el Cuadro 1 de NCCLS con un “o” que significa que estos tienen la misma efectividad contra los estafilococos.

Tomando en consideración que los ORSA por lo general tienen resistencia múltiple, hay limitadas opciones terapéuticas para tratar infecciones producidas por ORSA. Si la vancomicina, el principal agente prescrito, no es apropiada para

un paciente en particular con una infección por ORSA, será mejor que el médico consulte con un médico infectólogo o un farmacéutico clínico cuando desarrolle el plan de tratamiento. Este plan se basará en el estado clínico del paciente y los resultados de las pruebas de agentes complementarios.

El médico infectólogo podría pedir al laboratorio realizar pruebas con agentes que no forman parte del panel de rutina. Cada laboratorio debe desarrollar una estrategia para manejar agentes que no están en el panel de rutina. Esto podría involucrar un sistema de pruebas de respaldo o la identificación de un laboratorio de referencia que puede probar agentes complementarios en un plazo perentorio. En este caso, el médico trató al paciente exitosamente con linezolid.

REVISIÓN

Recuerde

- Usar los estándares más actualizados de NCCLS (M2 y M7) para analizar estafilococos.
- Usar la prueba de “screening” oxacilina agar-sal sólo para *S. aureus* y no para CoNS.
- Para ORSA y CoNS resistentes a oxacilina confirmados reportar todos los beta-lactámicos, incluyendo combinaciones de carbapenemes e inhibidores de beta-lactamasa, como resistentes, a pesar de los resultados in vitro.
- Usar los resultados de las pruebas de oxacilina y penicilina para deducir los resultados de otros beta-lactámicos en estafilococos.
- Advierta inquietudes especiales de las pruebas para detectar estafilococos con susceptibilidad reducida a vancomicina.

PREGUNTAS DE AUTO-EVALUACIÓN

1. Para cada una de las siguientes características, indique aquellas que se relacionan con ORSA y aquellas que se relacionan con BORSA
 - A. Contiene *mecA*
 - B. Contiene una nueva proteína de unión a la penicilina, PBP 2a
 - C. Contiene PBPs 1, 2, y 4 modificadas
 - D. Tiene resistencia múltiple
 - E. Es raro que se encuentre en muestras clínicas
2. ¿Cuál de los siguientes beta-lactámicos debe ser incluido en un panel de pruebas para *Staphylococcus* spp.? Seleccione todas las opciones que apliquen.
 - A. Penicilina
 - B. Oxacilina
 - C. Cefalosporina
3. ¿Cuál de las siguientes variedades adicionales de agentes antimicrobianos debe ser incluida en un panel de pruebas para estafilococos? Seleccione todas las opciones que apliquen.
 - A. Aminoglucósidos
 - B. Clindamicina
 - C. Fluoroquinolonas
 - D. Glicopéptidos
 - E. Macrólidos

- F. Tetraciclinas
G. Trimethoprim-sulfamethoxazole
4. ¿Si pone la prueba de difusión por disco en la incubadora a las 3PM, detectaría todos los ORSA si lee los cultivos a las 7AM del día siguiente?
- A. Sí
B. No
5. ¿Cuál de las siguientes afirmaciones es correcta para pruebas de difusión por disco o CIM de microdilución en caldo para estafilococos? Seleccione todas las opciones que apliquen.
- A. Inóculo de suspensión directa de colonias.
B. Log o fase estacionaria del inóculo
C. Adición de NaCl al 2% al caldo de Mueller-Hinton con ajuste de cationes para la prueba de microdilución en caldo
D. 16-18 horas de incubación para todos los antibióticos
E. 24 horas de incubación para oxacilina
F. 24 horas de incubación para vancomicina
6. Indique si cada uno de los siguientes perfiles es típico de ORSA.

Antibiótico	A	B	C
Clindamicina	R	S	R
Eritromicina	R	S	R
Oxacilina	R	R	R
Penicilina	R	R	S
Trimetoprima-sulfamethoxazole	R	S	S
Vancomicina	S	S	S

7. ¿Cuál de las siguientes frases sería correcta para un *S. aureus* resistente a eritromicina y susceptible a clindamicina? Seleccione todas las opciones que apliquen.
- A. Reporte clindamicina S
B. Reporte clindamicina R
C. Realizar la prueba de inducción de clindamicina rutinariamente, y si es positiva reportar R, si es negativa reportar S.
D. Realizar la prueba de inducción de clindamicina solo bajo pedido. Si es positiva reportar S acotando que puede desarrollarse resistencia durante el tratamiento con clindamicina. Si es negativa reportar S.
8. Conteste a las siguientes frases Verdadero o Falso
- A. Los métodos de difusión por disco detectan confiablemente VISA.
B. Es importante informar a control de infecciones y a las autoridades locales de salud pública sobre los pacientes con probable VISA.
C. Los aislamientos de VISA deben guardarse para estudios más exhaustivos, incluyendo remisión a las autoridades de salud pública.
D. *S. aureus* con una CIM a vancomicina de 4 µg/mL debe considerarse sospechoso de VISA
E. El crecimiento de *S. aureus* en caja de "screening" agar vancomicina BHI (6 µg/mL) después de 24 horas de incubación es sugestivo de VISA
F. Los aislamientos de VISA son comúnmente encontrados.

9. ¿Para un *S. aureus* que es resistente a la penicilina y susceptible a la oxacilina, cuál de los siguientes se consideraría susceptible? Seleccione todas las opciones que apliquen.
- A. Amoxicilina-clavulanato
 - B. Ampicilina
 - C. Cefalotina
 - D. Piperacilina
10. ¿Qué debería hacer usted?
- Escenario: Usted aísla *S. saprophyticus* de dos cultivos de sangre y un cultivo de orina. *S. saprophyticus* en sangre no es común pero puede ocurrir. El médico está interesado en los resultados de susceptibilidad, particularmente para oxacilina.
- A. Realizar una prueba de difusión por disco de oxacilina.
 - B. Realizar una prueba CIM de oxacilina y utilizar los criterios de interpretación para *S. aureus*.
 - C. Realizar una prueba CIM de oxacilina y utilizar los criterios de interpretación para CoNS.
 - D. Realizar un análisis *mecA* o PBP2a
 - E. Informar al médico que no hay pruebas confiables de susceptibilidad para *S. saprophyticus*.
11. Conteste a las siguientes frases Verdadero o Falso
- A. Tanto la suspensión directa de colonias como el método de fase log de crecimiento pueden ser utilizados para preparar los inóculos para difusión por disco o pruebas CIM con estafilococos.
 - B. La caja de “screening” oxacilina agar-sal puede ser usada para analizar la resistencia a la oxacilina en *S. aureus* y CoNS
 - C. Resultados de las pruebas de oxacilina deben ser usados para predecir la actividad de los cefemes contra estafilococos.
 - D. El disco de difusión de vancomicina no es confiable para *S. aureus*.

9

Enterococos

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Discutir un protocolo práctico para pruebas de sensibilidad a antibióticos (PSA) de *Enterococcus* spp. en el laboratorio clínico.
- Enumerar las condiciones necesarias para las pruebas de difusión en disco y CIM de *Enterococcus* spp., incluyendo medio de prueba, preparación del inóculo y atmósfera de incubación.
- Explicar la resistencia a vancomicina en enterococos, incluyendo la resistencia intrínseca de bajo nivel versus la resistencia adquirida de alto nivel.
- Describir la resistencia a los aminoglucósidos en enterococos y los métodos para detectar resistencia de alto nivel.
- Definir estrategias para limitar el uso de vancomicina en los reportes de laboratorio.

ANTECEDENTES

Los *Enterococcus* spp. son habitantes comunes del tracto gastrointestinal. En la mayoría de individuos inmunocompetentes el organismo no causa infecciones serias, a menos que invada las válvulas cardíacas y cause endocarditis. Este síndrome provoca una enfermedad grave que requiere terapia con aminoglucósidos y un agente con actividad en pared celular. El organismo también causa infecciones de vías urinarias, infecciones en heridas y septicemia, particularmente en un huésped debilitado. Los *Enterococcus* spp. son intrínsecamente resistentes a muchos agentes antimicrobianos incluyendo clindamicina, oxacilina y cefalosporinas. El tratamiento de infecciones enterocócicas severas tales como la endocarditis requiere un agente activo contra la pared celular (eje. ampicilina, penicilina o vancomicina) más un aminoglucósido como la gentamicina o estreptomina. Infecciones menos severas como las infecciones de vías urinarias pueden ser tratadas con un solo agente como ampicilina o nitrofurantoina.

Un creciente número de *Enterococcus* spp. ha desarrollado resistencia a ampicilina, vancomicina y exhibe un alto grado de resistencia a los aminoglucósidos. Nuevos agentes como linezolid y quinopristina-dalfopristina podrían ser utilizados para tratar cepas de enterococos resistentes a vancomicina (ERV).

CASO DE ESTUDION A

Un hombre de 54 años de edad acude al servicio de emergencia con fiebre de 39,5° C, mialgias y escalofríos intensos. Una semana antes, él notó ardor al orinar y orina

descolorida, pero no acudió al médico. En el examen físico, se observó un eritema con petequias en su tronco, hemorragias en forma de astillas debajo de sus uñas y un soplo cardíaco. Se obtuvieron muestras para cultivos de orina y sangre, y se inició al paciente una terapia de ampicilina y gentamicina. Al día siguiente, todos los cultivos dieron positivos para cocos gram-positivos dispuestos en pares y cadenas cortas. El organismo fue identificado como *Enterococcus faecium* y se emitió un reporte de laboratorio (ver abajo). Se diagnosticó que el paciente tenía una endocarditis bacteriana. La residente de cirugía que estaba encargada del paciente notó que el organismo fue reportado como resistente a ampicilina pero susceptible a gentamicina en la prueba tamiz de sinergia. Ella preguntó si esto significaba que la gentamicina sola sería una terapia adecuada.

Reporte de Laboratorio

Espécimen

Fuente: sangre

Resultados: *Enterococcus faecium*

Antimicrobiano	CIM (µg/mL)	Susceptibilidad
Ampicilina	64	R
Vancomicina	≥0,5	S
Sinergia de Gentamicina		S
Sinergia de Estreptomina		S

¿Cómo contestaría a la pregunta de la médica? Luego de completar este capítulo estará en capacidad de responder esta pregunta.

Resistencia en Enterococos

Tipos de Resistencia en Enterococos	
Intrínseca	Adquirida
<p>Los <i>Enterococcus</i> spp. tienen resistencia que ocurre en forma natural o intrínseca a:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cefalosporinas • Clindamicina • Penicilinas penicilinasas-estables (v.g., oxacilina) • Trimethoprim-sulfametoxazol • Concentraciones bajas o terapéuticas de aminoglucósidos 	<p>Los enterococos podrían adquirir resistencia a muchos agentes antimicrobianos. Entre estos los más importantes son:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ampicilina, penicilina y vancomicina • Alto nivel a gentamicina y estreptomina

Resistencia a Ampicilina y Penicilina

La resistencia de enterococos a ampicilina y penicilina es fundamentalmente debida a cambios en las proteínas de unión de penicilina (PLPs) que disminuyen la afinidad de las proteínas blanco por los antibióticos beta-lactámicos. Puesto que los antibióticos no se unen a sus blancos celulares, estos no inician la destrucción de la pared celular. Las cepas de *Enterococcus faecalis* son típicamente susceptibles a ampicilina y penicilina, mientras que el *Enterococcus faecium* es por lo general resistente. La resistencia que se debe a la producción de beta-lactamasa es rara.

Alto Nivel de Resistencia a Aminoglucósidos

Algunos enterococos producen enzimas que modifican a los aminoglucósidos confiriéndoles un alto nivel de resistencia a los mismos (HLAR, por sus siglas en inglés). Estas incluyen adeniltransferasas de aminoglucósido (AAD, por sus siglas en inglés), fosfotransferasas de aminoglucósido (APH, por sus siglas en inglés) y acetiltransferasas de aminoglucósido (AAC, por sus siglas en inglés). Cuando la enzima modifica al aminoglucósido, éste no puede ser transportado dentro de la célula para ejercer su efecto antibacteriano. En ese caso, **no hay sinergia con los agentes activos en la pared celular**. Las enzimas que modifican a los aminoglucósidos podrían modificar uno o más aminoglucósidos dependiendo del espectro de actividad de la enzima. Algunos enterococos podrían producir múltiples enzimas. Revise el siguiente cuadro para identificar a las enzimas comunes que modifican a los aminoglucósidos y los aminoglucósidos que ellas modifican.

Enzimas que modifican a los Aminoglucósidos en *Enterococcus* spp.

Enzima	Aminoglucósido ^a				
	Str	Gen	Tob	Net	Amk/Kan
AAD (6')	S ^b	N ^c	N	N	N
APH (3')	N	N	N	N	S
AAC (6') + APH (2')	N	S	S	S	S
AAC (6') ^d	N	N	S	S	S

^a Estreptomicina (Str), gentamicina (Gen), tobramicina (Tob), netilmicina (Net), amikacina/kanamicina (Amk/Kan)

^b S, sí modifica el respectivo aminoglucósido

^c N, no afecta la actividad del respectivo aminoglucósido

^d Se encuentra en virtualmente todos los *E. faecium*

La HLAR a la estreptomicina podría ser producida ya sea por enzimas que modifican a los aminoglucósidos o por alteración en los ribosomas, lo que disminuye la capacidad de los ribosomas para ligar el aminoglucósido.

Los beta-lactámicos y la gentamicina, actuando en conjunto, podrían ejercer una **sinergia bactericida** en los enterococos.

Denominaciones de Genotipo y Fenotipo para Vancomicina

La resistencia a la vancomicina se puede clasificar por genotipo o fenotipo.

Genotipo. Los genes *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanE* y *vanG* junto con varios genes complementarios median la resistencia a la vancomicina.

Fenotipo. El fenotipo es el efecto mensurable de la expresión de los genes. Por ejemplo, si el organismo porta el conglomerado del gene *vanA*, tendrá pruebas de CIM altas para vancomicina (y teicoplanina). El genotipo es *vanA*. (Todos los genes son designados con letras minúsculas itálicas). El fenotipo es el alto nivel de CIMs para estos medicamentos y es designado como VanA.

Sugerencia técnica: La teicoplanina no es usada terapéuticamente en los Estados Unidos, pero puede ser útil para determinar el fenotipo vancomicina de un enterococo.

Resistencia adquirida a vancomicina

Los aislamientos de algunas especies de enterococos pueden volverse resistentes a vancomicina por la adquisición de los genes *vanA* o *vanB* o menos frecuentemente *vanD*, *vanE* o *vanG*. Estas cepas con **resistencia adquirida a vancomicina** usualmente se conocen como “ERV”. Su contención merece especial atención del personal de control de infecciones. El *Enterococcus faecium* y el *E. faecalis* son los ERV más comunes. El *Enterococcus faecium* es más probable que sea ERV que el *E. faecalis*.

Resistencia intrínseca a vancomicina

La resistencia intrínseca de bajo nivel en los enterococos usualmente se debe a la presencia de genes *vanC*. Estos genes inhiben la unión de la vancomicina al microorganismo. La resistencia intrínseca es poco probable que se disemine de paciente a paciente y usualmente no constituye una preocupación para el personal de control de infecciones.

Resistencia – Patrones Típicos en especies de *Enterococos*

Los patrones típicos de susceptibilidad por especie incluyen:

- *E. faecalis*
Usualmente susceptible a ampicilina y penicilina.
Puede adquirir resistencia a vancomicina, usualmente por *vanA* o *vanB*.
Ocasionalmente produce beta-lactamasa.
- *E. faecium*
Con frecuencia resistente a ampicilina y penicilina.
Puede adquirir resistencia a vancomicina, usualmente por *vanA* o *vanB*.
- *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*
Tiene resistencia **intrínseca** de bajo nivel a vancomicina por el gene *vanC*.
- *E. raffinosus*, *E. avium* y *E. durans*
Puede adquirir resistencia a vancomicina por los genes *vanA* o *vanB* o, menos frecuentemente, por los genes *vanD*, *vanE*, o *vanG*.

Estrategia de Pruebas

El NCCLS sugiere la siguiente estrategia para enterococos (NCCLS M100, Cuadro 1, Grupo A).

- Ampicilina o penicilina deben ser probadas y reportadas rutinariamente.
- Vancomicina y linezolidina deben ser probadas rutinariamente y reportadas selectivamente (NCCLS Grupo B).
- Sólo los aislamientos de *E. faecium* deben ser probados para quinopristina-dalfopristina.
- Las pruebas de susceptibilidad generalmente se realizan en enterococos aislados de sitios corporales estériles. Los aislamientos de otros sitios podrían ser analizados dependiendo de las prácticas de la institución y la población de pacientes.

Métodos

El NCCLS tiene estándares específicos para pruebas de *Enterococcus* spp. Para vancomicina se usa los métodos de rutina de difusión por disco y CIM con las siguientes modificaciones:

Modificaciones para las pruebas de *Enterococcus* spp. con vancomicina

Método	Medio	Tiempo de Incubación (h)
Difusión de disco ^a	MHA ^b	24
Dilución en caldo o agar	CAMHB ^c	24

^a Cualquier zona de inhibición debe ser examinada con luz transmitida y CUALQUIER crecimiento entre la zona de inhibición (velo o película), debe ser considerado como resistente. Los aislamientos que producen una zona de inhibición en el rango intermedio deben ser analizados con un método de CIM.

^b Agar Mueller-Hinton.

^c Caldo Mueller-Hinton con cationes ajustados.

Cómo Interpretar los Resultados

En el documento M100 NCCLS, Cuadro 2D (en ambas secciones: difusión por disco y CIM) hay criterios específicos de interpretación para enterococos analizados con ampicilina y penicilina. Los criterios de interpretación de CIM tanto para ampicilina como para penicilina son:

<8 µg/mL = Susceptible

>16 µg/mL = Resistente

Nota: No hay un límite intermedio para ninguno de los dos agentes antimicrobianos.

En *E. faecium*, la resistencia a ampicilina o penicilina de bajo nivel está asociada con CIMs de 16-32 µg/ml o 32-64 µg/ml, respectivamente. Sin embargo, el *E. faecium* puede adquirir resistencia de alto nivel a beta-lactámicos (ampicilina CIMs > 64 µg/ml y penicilina CIMs > 128 µg/ml). *E. faecium* con resistencia de bajo nivel a ampicilina o penicilina podría continuar presentando sinergia con un aminoglucósido al que es susceptible, en cambio aquellos con resistencia de alto nivel generalmente no muestran sinergia.

Pruebas de Beta-lactamasa

Las pruebas de beta-lactamasa en enterococos se realizan mejor usando la prueba de cefalosporina cromogénica (nitrocefina). Dado que la cantidad de beta-lactamasa producida por los enterococos es baja, las pruebas estándar de difusión por disco y CIM con frecuencia no clasifican correctamente estas cepas como resistentes a penicilina y ampicilina. Los aislamientos que producen beta-lactamasa deben ser reportados como resistentes a ampicilina y penicilina a pesar de los resultados de susceptible de la difusión por disco o CIM.

Prueba tamiz de Agar Vancomicina

La prueba tamiz de agar vancomicina es realizada en aislamientos de enterococos disponibles en cultivo puro, o cuando están disponibles colonias aisladas. Es un método simple y barato para tamizar ERV. La placa tamiz contiene 6 µg/mL de vancomicina en agar infusión de cerebro corazón (BHIA).

Para realizar la prueba:

1. Use el crecimiento o el método de suspensión directa de colonias para preparar la suspensión estandarizada del inóculo a una turbidez equivalente a estándar 0,5 de McFarland.
2. Utilizando un dispositivo que emita de 1 a 10 μL de la suspensión estandarizada, inocule y extienda la suspensión en la superficie de agar como si se tratara de una mancha (si se hace con cuidado para evitar contaminación cruzada, pueden ser analizados hasta ocho aislamientos en una placa de 100 mm).
3. Incube la placa durante 24 horas seguidas antes de reportar los resultados de susceptibilidad.
4. Considere >1 colonia como resistencia “presuntiva”. Resistencia presuntiva significa que el aislamiento podría haber adquirido resistencia a vancomicina; sin embargo, podría ser una especie con resistencia intrínseca a vancomicina.

Sugerencia técnica: Pruebas de identificación junto con pruebas de difusión por disco o CIM son necesarias para diferenciar aislamientos con resistencia intrínseca a vancomicina de aquellos con resistencia adquirida.

Se deben usar **controles** positivos y negativos cada vez que se realice la prueba.

- Control negativo: *E. faecalis* ATCC 29212 (susceptible a vancomicina)
- Control positivo: *E. faecalis* ATCC 51299 (resistente a vancomicina)

Pruebas Tamiz de Sinergia para Resistencia de Alto Nivel de Aminoglucósidos

Las pruebas tamiz de sinergia para resistencia de alto nivel de aminoglucósidos son realizadas con un disco especial o una sola concentración de gentamicina o estreptomycinina para determinar si el aminoglucósido actúa sinérgicamente cuando se combina con un agente activo contra la pared celular. La prueba de gentamicina o estreptomycinina predice la actividad de otros aminoglucósidos.

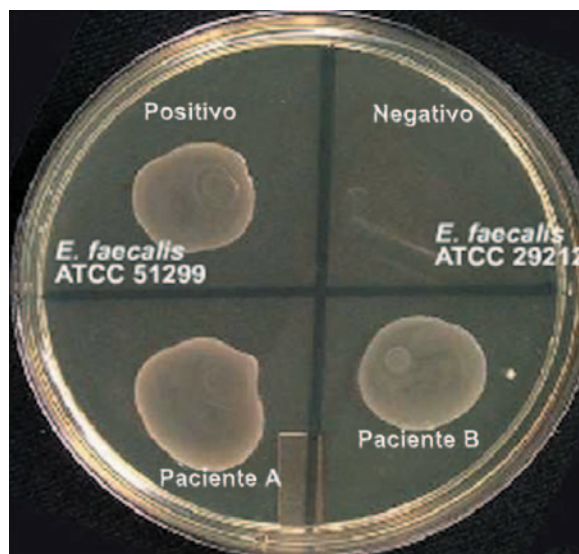


Figura 9.1—Una placa tamiz de vancomicina con controles positivos y negativos.

Prueba tamiz de sinergia por medio de difusión por disco

- Use el procedimiento estándar de difusión por disco
- Use discos de alta carga: gentamicina 120 µg y estreptomicina 300 µg.
- Incube por 16-18 horas a 35°C en atmósfera ambiental.

Resultados – Cómo interpretar los diámetros de zona

- <6 mm = resistente
- >10 mm = susceptible.
- 7-9 mm = no concluyente e indica que debe ser realizada una prueba de CIM.

Pruebas CIM de Tamizaje para Resistencia de Alto Nivel de Aminoglucósidos.

Procedimiento:

Para los métodos de dilución, tanto en caldo como en agar, siga los procedimientos estándar NCCLS con las siguientes modificaciones:

1. Para pruebas de dilución en caldo y agar, pruebe las siguientes concentraciones separadamente:
500 µg/mL de gentamicina en CAMHB o MHA
1.000 µg/mL de estreptomicina en CAMHB
2.000 µg/mL de estreptomicina en MHA
2. Para tamiz en agar, aplique 10 µl de una suspensión del organismo que está analizando ajustada al estándar 0,5 de McFarland sobre la superficie de agar.
3. Incube las pruebas de gentamicina por 24 h a 35°C en atmósfera ambiental.
4. Incube las pruebas de estreptomicina por 24-48 h (si es susceptible a las 24 h, reincube la prueba por 24 h más) a 35°C en atmósfera ambiental.

Interpretación de resultados

- Si no hay crecimiento, el resultado es susceptible.
- Agar: crecimiento de >1 colonia indica resistencia
- Caldo: cualquier turbidez o crecimiento indica resistencia

Control de Calidad

Para asegurar que los resultados de las pruebas de tamizaje para resistencia de alto nivel de aminoglucósidos sean precisos, es esencial incluir los siguientes controles con cada prueba:

- El control negativo, *E. faecalis* ATCC 29212, es susceptible a gentamicina a 500 µg/mL y estreptomicina a 1,000 µg/mL (caldo) o 2,000 µg/mL (agar).
- El control positivo, *E. faecalis* ATCC 51299, es resistente a las mismas concentraciones anteriores de cada antibiótico.



Figura 9.2—Pigmento amarillo de *E. casseliflavus* en un hisopo de algodón.)

Estas recomendaciones para pruebas de tamizaje para resistencia de alto nivel de aminoglucósidos y resistencia a vancomicina se encuentran en la porción de CIM Cuadro 2D del documento M100 del NCCLS. Este cuadro también incluye sugerencias para distinguir aislamientos con resistencia intrínseca a vancomicina versus resistencia adquirida.

Diferenciación de *Enterococcus* spp.

Las pruebas de pigmento y motilidad son usualmente suficientes para diferenciar enterococos con resistencia adquirida a vancomicina (usualmente *E. faecalis* o *E. faecium*) de aquellos con resistencia intrínseca a vancomicina (*E. gallinarum* o *E. casseliflavus*). Como se presenta en el siguiente cuadro, la prueba de metil-alfa-D-glucopiranosido (MGP) es útil cuando los resultados de pigmento y motilidad son ambiguos.

Pruebas para diferenciar las especies de *Enterococos*

Especie	Motilidad	Pigmento Amarillo ^a	MGP ^b
<i>E. faecalis</i>	—	—	—
<i>E. faecium</i>	—	—	—
<i>E. casseliflavus</i>	+ ^c	+	+
<i>E. gallinarum</i>	+ ^c	—	+

^a Se puede observar pigmento en un hisopo de algodón.

^b Acidificación de metil-alfa-D-glucopiranosido.

^c Pueden ocurrir excepciones.

Para obtener una identificación definitiva de las especies de enterococos se pueden utilizar sistemas comerciales de pruebas de identificación y pruebas bioquímicas convencionales. La identificación de especies es recomendada para enterococos resistentes a vancomicina.

COMO REPORTAR RESULTADOS DE SITIOS ESTÉRILES

Reporte los resultados de las pruebas con agentes activos en pared celular y altos niveles de aminoglucósidos en aislamientos de sitios del cuerpo que normalmente son estériles (eje., sangre, líquido cefalorraquídeo) para los cuales podría necesitarse una terapia combinada. Revise el siguiente cuadro que indica como predecir sinergia examinando los resultados de la prueba con agentes activos contra pared celular y aminoglucósidos de alta carga.

Aminoglucósido ^a	Medicamento activo en pared celular	
	Susceptible	Resistente
Susceptible	Sinergia	No hay sinergia
Resistente	No hay sinergia	No hay sinergia

^a Requiere pruebas especiales para resistencia de alto nivel a gentamicina y estreptomina.

El cuadro anterior demuestra que tanto el agente activo contra pared celular (ampicilina, penicilina o vancomicina) como el aminoglucósido deben mostrar resultados de susceptibilidad para que ocurra la sinergia. Si hay resistencia a cualquiera de los antibióticos no habrá sinergia.

Sugerencia técnica: Cuando reporte los resultados, se debe adjuntar al informe una nota (ver el siguiente ejemplo) para enfatizar la necesidad de terapia combinada en caso de infecciones enterocócicas serias como la endocarditis.

Reporte de Laboratorio

Espécimen

Fuente: sangre

Resultados: *Enterococcus faecalis**

Antimicrobiano	CIM (µg/mL)	Susceptibilidad
Ampicilina	2	S
Vancomicina	0,5	S
Sinergia gentamicina		S
Sinergia estreptomina		S

* Comentario: La endocarditis enterocócica requiere una terapia combinada con altas dosis de penicilina (o altas dosis de ampicilina, o vancomicina o teicoplanina) más gentamicina o estreptomina para cumplir con la acción bactericida.

COMO REPORTAR RESULTADOS DE ORINA

Reporte los resultados de agentes antimicrobianos adicionales (eje., fluoroquinolonas y nitrofurantoína) que son útiles para tratar infecciones enterocócicas de vías urinarias.

No es necesario reportar los resultados de pruebas de sinergia de aminoglucósidos puesto que la terapia combinada no está justificada para infecciones enterocócicas de vías urinarias no complicadas (ver el siguiente reporte).

Reporte de Laboratorio

Especimen

Fuente: Orina

Resultados: *Enterococcus* spp.

Agente Antimicrobiano	Susceptibilidad
Ampicilina	S
Ciprofloxacina	S
Nitrofurantoina	S
Tetraciclina	S
Vancomicina	S

**COMO REPORTAR RESULTADOS:
ADVERTENCIA**

Resultados de cefalosporinas, clindamicina, trimetoprima-sulfametoxazol y aminoglucósidos (excepto para alto nivel de resistencia o prueba tamiz de sinergia), NO deben ser reportados a pesar de que estos podrían demostrar resultados susceptibles *in vitro*. Estos medicamentos no son clínicamente útiles contra los enterococos.

Sugerencia técnica: El reportar resultados susceptibles con estos medicamentos podría alentar a un médico a prescribir uno de estos agentes, lo que sería una tergiversación peligrosa. Es imperativo tomar precauciones para evitar este tipo de reporte erróneo.

**COMO REPORTAR RESULTADOS CON
AGENTES COMPLEMENTARIOS PARA
ERV**

El siguiente reporte para ERV aislado de sangre de un paciente con transplante de hígado, a pesar de ser preciso, no ofrece orientación sobre los agentes antimicrobianos a considerar para el tratamiento del paciente.

Reporte de LaboratorioFuente del espécimen: *sangre*Resultados: *Enterococcus faecium*

Agente Antimicrobiano	CIM (µg/mL)	Susceptibilidad
Ampicilina	>64	R
Vancomicina	>32	R
Sinergia gentamicina		R
Sinergia estreptomycin		R

Agentes complementarios para considerar en el reporte para ERV (después de consultar con médicos infectólogos, farmacéuticos y personal clínico) podrían incluir cloramfenicol, eritromicina, linezolid, nitrofurantoina (solo en aislamientos de orina), quinopristina-dalfopristina, rifampicina y tetraciclina (o doxiciclina).

Vea el siguiente reporte complementario ampliado.

Reporte de Laboratorio

Fuente del espécimen: *sangre*

Resultados: *Enterococcus faecium**

Agente Antimicrobiano	CIM (µg/mL)	Susceptibilidad
Ampicilina	>64	R
Cloramfenicol	8	S
Doxiciclina	2	S
Eritromicina	>8	R
Linezolida	1	S
Quinopristina-Dalfopristina	0,5	S
Rifampicina	8	R
Vancomicina	>32	R*
Sinergia gentamicina		R
Sinergia estreptomina		R

* Comentario: se aisló ERV. Por favor notificar al personal de control de infecciones.

Debido a que la terapia más apropiada para las infecciones por ERV depende de una variedad de factores clínicos, además del reporte de la prueba de susceptibilidad, los médicos deben ser alentados a consultar con especialistas en enfermedades infecciosas para el manejo del paciente.

Control de Calidad

Revise el capítulo de Aseguramiento de Calidad/Control de Calidad para instrucciones específicas en el control de calidad de las pruebas para *Enterococcus* spp.

Las cepas de control de calidad recomendadas por el NCCLS para las pruebas de tamizaje de agar vancomicina y alto nivel de aminoglucósido son:

- *E. faecalis* ATCC 51299, cepa de control positivo (resistente)
- *E. faecalis* ATCC 29212, cepa de control negativo (susceptible)

La cepa de control de calidad recomendada para la prueba de CIM de *Enterococcus* spp. es *E. faecalis* ATCC 29212

Nota: No hay rangos aceptables de control de calidad publicados para difusión por disco o CIM para *E. faecalis* ATCC 51299

Comentario sobre el Caso de Estudio A

Ahora usted debe ser capaz de responder a la pregunta de la doctora: “¿Puede usarse gentamicina sola para la terapia? Mi paciente está recibiendo ampicilina y gentamicina y el reporte de laboratorio (ver a continuación) muestra que el aislamiento es resistente a ampicilina.”

Agente Antimicrobiano	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptibilidad
Ampicilina	64	R
Vancomicina	$\leq 0,5$	S
Sinergia gentamicina		S
Sinergia estreptomicina		S

Preguntas sobre el Caso de Estudio A:

1. En base al reporte de laboratorio, ¿Puede usarse únicamente gentamicina en la terapia de este paciente con endocarditis bacteriana?

- A. Sí
- B. No

Respuesta y comentario:

A. Incorrecta. La terapia combinada con un agente activo contra pared celular y un aminoglucósido es necesaria para obtener sinergia bactericida. Puesto que este aislamiento es resistente a ampicilina, la vancomicina sería la alternativa como agente activo contra pared celular. La gentamicina sola no penetra las células enterocócicas y no puede ser usada como agente único para tratar infecciones enterocócicas.

B. Correcta.

2. ¿Qué terapia podría ser considerada para el paciente en el estudio de caso?

- A. Ampicilina y gentamicina
- B. Vancomicina y gentamicina
- C. Vancomicina sola
- D. Ampicilina sola

Respuesta y comentario:

B. Es la respuesta correcta. La doctora cambió la terapia de ampicilina a vancomicina y continuó el tratamiento por 4 semanas, tiempo en el cual el paciente ya no tuvo síntomas de endocarditis.

Vigilancia ERV

Para mejorar la detección de pacientes colonizados con ERV, su especialista en enfermedades infecciosas podría pedir que se tomen cultivos de vigilancia de pacientes seleccionados para identificar aquellos colonizados con ERV. Los cultivos de vigilancia más frecuentemente recolectados son muestras rectales tomadas con hisopo y muestras de heces.

Los especímenes rectales para vigilancia de ERV son inoculados en un medio que suprime la flora normal de las heces, mientras que acrecienta el crecimiento de ERV. Un ejemplo de un medio selectivo es el agar bilis esculina azida (BEA) que contiene de 6 a 10 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina.

Los ERV potenciales deben ser confirmados bioquímicamente, y el patrón de resistencia debe ser confirmado para asegurar que los aislamientos enterocócicos representen resistencia adquirida a vancomicina.

El reporte del laboratorio para vigilancia de ERV debe limitarse a:

- Se aisló ERV.
- No se aisló ERV.

El aislamiento de ERV de las muestras de heces o contenido rectal indica que el paciente está colonizado con ERV y no obliga al uso de terapia antimicrobiana.

Los cultivos de vigilancia de ERV y otros organismos se deben realizar sólo a pedido del personal de control de infecciones. No busque ERV en muestras de heces enviadas al laboratorio de microbiología para identificación de patógenos entéricos, a menos que sea pedido específicamente por el personal de control de infecciones.

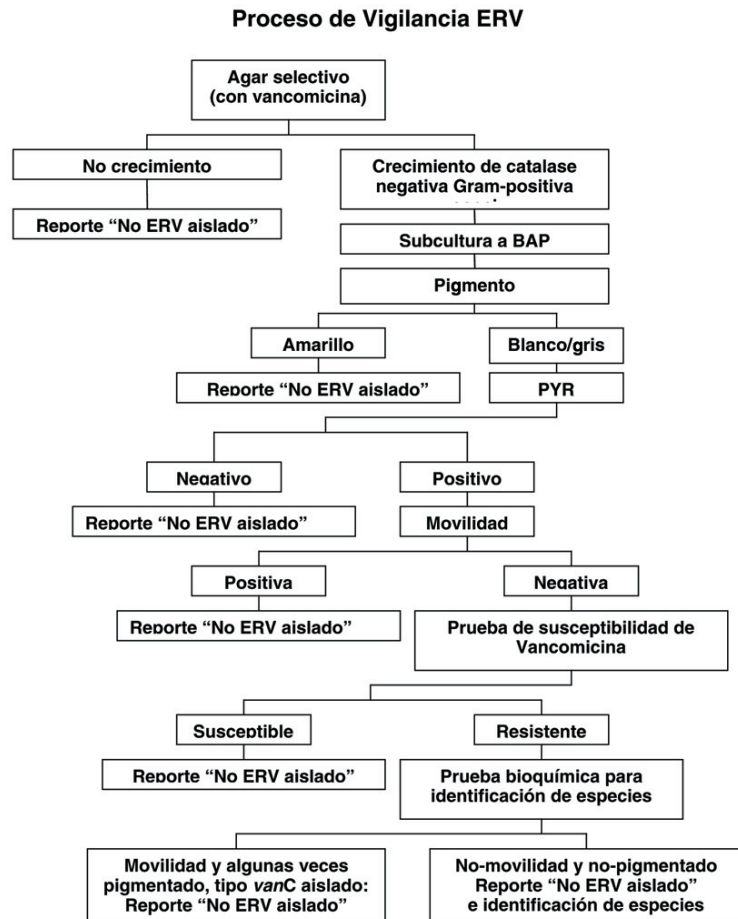


Figura 9.3—Flujograma del proceso de vigilancia de ERV.

RESUMEN

El lector ahora debe conocer las recomendaciones para pruebas de rutina de susceptibilidad antimicrobiana y reporte de *Enterococcus* spp.

Recuerde:

- Usar los estándares más actualizados del NCCLS (M2, M7 y M100) para obtener las instrucciones de las pruebas de *Enterococcus* spp.
- Realizar pruebas tamiz de sinergia para alto nivel de aminoglucósidos en aislamientos para los cuales la terapia combinada podría estar indicada (eje., aislamientos asociados con endocarditis enterocócica).
- Realizar pruebas de identificación para diferenciar aislamientos con resistencia intrínseca a vancomicina (eje., *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*) de aislamientos con resistencia adquirida a vancomicina (eje., *E. faecium* y *E. faecalis*).
- Desarrollar políticas de prueba y reporte de ERV en conjunto con el personal de control de infecciones.

Resumen de los Métodos para Pruebas de Susceptibilidad de Enterococos

1. Difusión por disco
 - A. Agar Mueller-Hinton
 - B. Incubación, 16-18 h en atmósfera ambiental a 35-37°C. Para vancomicina incube 24 h.
2. CIM en caldo
 - A. Caldo Mueller-Hinton con cationes ajustados
 - B. Incubación, 16-18 h en atmósfera ambiental a 35-37°C. Para vancomicina incube 24 h.
3. Preparación de inóculo
 - A. Use el método directo de estandarización
 - B. Seleccione colonias frescas de una placa de sangre de 20-24 horas
 - C. Suspenda las colonias en caldo o solución salina
 - D. Ajuste inmediatamente la suspensión al estandar 0,5 de McFarland e inocule inmediatamente en el medio de prueba de susceptibilidad
4. Prueba de CIM
 - A. Asegure un crecimiento adecuado en la fuente de control de crecimiento
 - B. Lea la CIM como la concentración más baja del agente que inhibe un crecimiento visible
5. Prueba de beta-lactamasa
 - A. Cefalosporinasa cromogénica (nitrocefina)
 - B. Si el resultado es positivo el reporte de ampicilina y penicilina debe ser revisado como "Resistente"
6. Prueba tamiz de agar vancomicina
 - A. Agar infusión cerebro corazón que contiene 6 µg/ml de vancomicina
 - B. Use un crecimiento en caldo o el método directo de colonias para ajustar el inóculo al estandar 0,5 de McFarland
 - C. Aplique 1-10 µL en forma de mancha en la superficie de agar.
 - D. Incube por 24 h completas en atmósfera ambiental a 35-37°C.
 - E. Más de 1 colonia indica posible resistencia.
 - F. Realice pruebas de identificación y difusión por disco o CIM para clasificar más detalladamente el aislamiento.

7. Tamizaje de sinergia para alto nivel de resistencia a aminoglucósidos
 - A. Procedimiento estándar de difusión por disco
 1. Discos especiales con alta carga de aminoglucósidos
 2. Incube 16-18 h a 35°C en atmósfera ambiental.
 - B. Pruebas CIM
 1. Método de tamizaje en agar
 2. Pruebas de dilución en caldo
 3. Incube gentamicina por 24 h a 35°C en atmósfera ambiental.
 4. Incube estreptomycin por 24-48 h (cepas susceptibles incube 24 h adicionales) a 35°C en atmósfera ambiental.
8. Interpretación
 - A. Use el Cuadro 2D del documento M100 del NCCLS
 - B. Límites para ampicilina o penicilina <8 = susceptible y >16 = resistente.
 - C. No hay límite intermedio para ampicilina o penicilina
 - D. *E. faecium* con resistencia de bajo nivel a ampicilina (16-32 µg/mL) o penicilina (32-64 µg/mL) podría tener sinergia con aminoglucósidos, mientras que no la tendrá si la resistencia es de alto nivel.
9. Realizar control de calidad
 - A. Cepa de control CIM *E. faecalis* ATCC 29212
 - B. Control de calidad con prueba tamiz en agar vancomicina y alto nivel de aminoglucósido.
 1. *E. faecalis* ATCC 51299, cepa de control positivo (resistente)
 2. *E. faecalis* ATCC 29212, cepa de control negativo (susceptible)

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

1. ¿Cuál es la especie más común de ERV?
 - A. *E. faecalis*
 - B. *E. faecium*
 - C. *E. casseliflavus*
 - D. *E. gallinarum*
2. ¿Por qué los enterococos con resistencia a vancomicina adquirida (eje., tipo *vanA* o *vanB*) son más importantes desde la perspectiva del control de infecciones que aquellos con resistencia a vancomicina intrínseca (eje., tipo *vanC*)?
 - A. Los elementos genéticos que son responsables de la resistencia adquirida pueden diseminarse a otras bacterias.
 - B. Los aislamientos intrínsecamente resistentes nunca causan infecciones.
 - C. Los aislamientos con resistencia adquirida con frecuencia presentan resistencia múltiple y son difíciles de tratar, por lo tanto su diseminación entre pacientes debe ser controlada.
3. ¿Qué debe hacer si su prueba de difusión por disco para enterococo arroja un resultado intermedio a vancomicina ?
 - A. Reportar el resultado como resistente.
 - B. Realizar una prueba de CIM para vancomicina.
4. ¿Sería apropiado realizar pruebas de sinergia con tobramicina o amikacina si un enterococo tiene alto nivel de resistencia a gentamicina y estreptomycin?
 - A. Sí
 - B. No
5. ¿ Cuando se analizan enterococos, cuál de las siguientes pruebas debería ser realizada en un laboratorio clínico si hubiese sinergia entre un medicamento específico con acción contra la pared celular (eje., ampicilina, penicilina o vancomicina) y un aminoglucósido (eje., gentamicina o estreptomycin)?
 - A. Pruebas de sinergia con el medicamento de acción contra pared celular y el aminoglucósido en el mismo tubo.

- B. Pruebas individuales para el medicamento de acción *S. aureus* ATCC contra pared celular y para altas cargas de aminoglucósidos.
 - C. Pruebas individuales para el medicamento de acción contra pared celular y para aminoglucósidos a concentraciones estándar (eje., terapéutica).
6. ¿Por qué se puede utilizar únicamente ampicilina para tratar infecciones agudas de vías urinarias no complicadas causadas por enterococos?
- A. Casi todos los aislamientos que causan infecciones de vías urinarias por enterococo son susceptibles a ampicilina.
 - B. La ampicilina es concentrada en la orina y los niveles típicamente exceden a los requeridos para inhibir el crecimiento de *E. faecalis* y *E. faecium*.
7. Si un aislamiento de orina del paciente creció con la prueba tamiz de agar vancomicina, ¿Cuál es el siguiente paso que debe dar?
- A. Reportar el aislamiento como resistente a vancomicina
 - B. Realizar pruebas de pigmento y motilidad.

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
Levofloxacina	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, ceftriaxona 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 cefalorraquídeo. 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.
- 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.
 - Usando la suspensión en fase logarítmica de organismos que crecieron en caldo Mueller-Hinton por dos horas a 35°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.
- Prueba CIM de ampicilina
 - Prueba de disco de oxacilina
 - Prueba CIM de penicilina
 - 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?
- Reportar como resistente a oxacilina
 - Reportar como resistente a penicilina
 - Realizar pruebas de CIM con penicilina y cefotaxima o ceftriaxone
 - 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.

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Describir una estrategia práctica para realizar pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos (PSA) de *Streptococcus sp.* incluyendo medios usados, preparación de inóculo, atmósfera y duración de la incubación.
- Describir los documentos que delimitan los métodos de prueba de difusión en disco y CIM para estreptococo.
- Discutir los métodos apropiados para analizar e informar resultados, incluyendo criterios de interpretación para los estreptococos del grupo viridans y beta-hemolíticos aislados de varios tipos de infecciones.
- Discutir el fundamento para las PSA de estreptococos, incluyendo las razones por las cuales las pruebas rutinarias no son necesarias para estreptococos beta-hemolíticos.

ANTECEDENTES

Los estreptococos no neumocócicos son clasificados en dos grupos de acuerdo a su capacidad de hemolizar los glóbulos rojos de cordero. Los aislamientos que lisan por completo o hemolizan glóbulos rojos se denominan estreptococos beta-hemolíticos. Tomando como base las características antigénicas del carbohidrato C ubicado en su pared celular, los estreptococos beta-hemolíticos se clasifican además en grupos A, B, C, D, F y G. Aquellas especies que hemolizan solo parcialmente los glóbulos rojos se denominan estreptococos del grupo viridans. Existen por lo menos 20 especies de estreptococos del grupo viridans. Los estreptococos viridans forman parte de la flora normal de los aparatos gastrointestinal y respiratorio de los seres humanos. Las especies comunes incluyen *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus sanguis*.

Los estreptococos del Grupo A (*Streptococcus pyogenes*) son responsables de las “infecciones estreptocócicas de garganta” y también son asociados con escarlatina y el síndrome de choque tóxico estreptocócico. Las secuelas de infecciones por *S. pyogenes* incluyen fiebre reumática y glomerulonefritis. El tratamiento temprano puede minimizar estas serias complicaciones de las infecciones del Grupo A. Los estreptococos del Grupo B (*Streptococcus agalactiae*) colonizan con frecuencia la vagina y son una de las principales causas de enfermedad neonatal en los Estados Unidos. Otros estreptococos beta-hemolíticos causan una variedad de infecciones.

Los estreptococos beta-hemolíticos no han demostrado resistencia a la penicilina, que es el medicamento de elección para estas infecciones. Al contrario de los estreptococos beta-hemolíticos, algunos estreptococos del grupo viridans no son

susceptibles a penicilina porque contienen proteínas de unión a la penicilina (PBPs) alteradas. La resistencia a otros agentes antimicrobianos, como eritromicina y tetraciclina, varía de cepa en cepa.

Los estreptococos del grupo viridans están entre las principales causas de endocarditis bacteriana. La terapia generalmente incluye penicilina y un aminoglucósido y con frecuencia es orientada por el grado de susceptibilidad a la penicilina (como se puede ver en el siguiente cuadro). Por lo tanto, la disponibilidad de una prueba precisa de CIM de penicilina es importante para la atención al paciente.

Terapia sugerida para endocarditis causada por estreptococos del grupo viridans

Penicilina CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Terapia sugerida
$\leq 0,1$	Penicilina +/- Gentamicina, o Ceftriaxone
$>0,1- <0,5$	Penicilina + Gentamicina
$\geq 0,5$	Penicilina o Ampicilina + Gentamicina
$\geq 4,0$	Vancomicina +/- Gentamicina

CASO DE ESTUDIO

Una mujer de 72 años de edad acudió al servicio médico por presentar varios días de malestar general y fiebre. Ella se había sometido a un extenso tratamiento dental diez días antes del inicio de la fiebre. Debido a que tenía una prótesis valvular en la aorta se le administró una dosis única de amoxicilina antes del tratamiento dental.

La revisión de la historia de la paciente y el examen físico sugirieron el diagnóstico de endocarditis bacteriana subaguda. Se obtuvieron dos cultivos de sangre. Un ecocardiograma transesofágico reveló una vegetación de 4-mm en su válvula mitral. Se le inició a la paciente un régimen de penicilina y gentamicina. Dos días después el laboratorio reportó crecimiento de estreptococos del grupo viridans en ambos cultivos. El médico solicitó que se realice una prueba de susceptibilidad a la penicilina en el aislamiento.

¿Cuál sería la mejor manera de proceder?

Luego de completar este capítulo el lector será capaz de responder a esta pregunta.

Resistencia—Penicilina

Estreptococo beta-hemolítico

La resistencia a la penicilina todavía no se ha observado entre los estreptococos beta-hemolíticos. Las CIMs típicas de penicilina para los grupos A, C y G son $< 0,03 \mu\text{g/mL}$. Las CIMs de penicilina para estreptococos del grupo B son por lo general más altas pero en el rango de susceptibilidad es entre $0,06-0,12 \mu\text{g/mL}$.

Estreptococo del grupo viridans

La resistencia a la penicilina (esto es, CIM $>4 \mu\text{g/mL}$) entre los estreptococos del grupo viridans ha estado incrementándose alrededor del mundo. La resistencia se debe a alteraciones en las proteínas de unión a la penicilina (PBPs) y es más común entre las cepas de *S. mitis* y *S. sanguis*.

Resistencia—Cefalosporinas de amplio espectro

Estreptococos beta-hemolíticos:

La resistencia a cefalosporinas de amplio espectro no ha sido reportada entre los estreptococos beta-hemolíticos.

Estreptococos del grupo viridans:

Los estreptococos del grupo viridans que son resistentes a la penicilina podrían exhibir una susceptibilidad reducida o resistencia (esto es, $>4 \mu\text{g/mL}$) a las cefalosporinas de amplio espectro. Tales cepas resistentes son raras.

Resistencia—Macrólidos, Lincosamidas y Estreptogramina B

Estreptococos beta-hemolíticos

Grupo A - la incidencia de resistencia a la eritromicina varía considerablemente en diferentes regiones geográficas y ha excedido el 50% en algunas regiones. Esto parece reflejar el uso de eritromicina. La susceptibilidad a eritromicina puede ser usada para predecir la susceptibilidad tanto para azitromicina como para claritromicina.

Grupo B - La resistencia a eritromicina ha sido reportada como alta alcanzando hasta el 25% en los Estados Unidos; la incidencia de resistencia a clindamicina es alrededor de la mitad de la eritromicina.

Los mecanismos de resistencia a macrólidos en estreptococos beta-hemolíticos incluyen:

- La producción de una metilasa ribosómica de resistencia a eritromicina que es mediada por los genes del grupo *ermA* y *ermB*. Los genes *erm* confieren resistencia a agentes como macrólidos, lincosamidas (eje., clindamicina) y estreptogramina B. Esta resistencia puede ser inducible o constitutiva y se la conoce como resistencia MLS_B .
- La efusión de macrólidos es mediada por el gene *mefA*. La resistencia es con frecuencia llamada “fenotipo M” porque solo los macrólidos son afectados. Estas cepas permanecen susceptibles a clindamicina.
- Las mutaciones en los genes ribosómicos de ARN que usualmente confieren resistencia a macrólidos y estreptogramina (fenotipo MS) son relativamente causas raras de resistencia.

Resistencia—Otros Agentes

La resistencia a otros agentes como quinopristina-dalfopristina y fluoroquinolonas es baja entre *Streptococcus* spp. Los estreptococos del grupo B usualmente son resistentes a tetraciclinas. Los estreptococos no han demostrado resistencia a vancomicina o linezolida.

Estrategia de Prueba

Estreptococos beta-hemolíticos

Puesto que todos los estreptococos beta-hemolíticos son susceptibles a la penicilina, no hay necesidad de analizar rutinariamente estos aislamientos. Debido a que

algunos pacientes no pueden tolerar la penicilina, en caso de infecciones serias, es útil realizar pruebas de resistencia a eritromicina en estreptococos del Grupo A y a clindamicina y eritromicina en estreptococos del Grupo B.

Cuando se prueban estreptococos beta-hemolíticos para susceptibilidad a eritromicina y clindamicina, un procedimiento normal de difusión por disco debe ser incorporado usando un disco de clindamicina de 2 µg colocado a 12 mm (medido de extremo a extremo) de un disco de eritromicina de 15 µg esto se conoce como la prueba de aproximación de disco, “D test”. Seguido de la incubación las zonas que muestran un “D test” positivo tienen un achatamiento de la zona clindamicina junto al disco de eritromicina, como se muestra en la Figura 8.7. Estas cepas demuestran resistencia inducible a clindamicina por lo tanto deben ser reportadas como resistentes a clindamicina. Las cepas con un diámetro de zona de clindamicina de ≥ 19 mm y sin achatamientos de la zona deben ser reportadas como susceptibles.

En la literatura han aparecido reportes sobre *S. agalactiae* que “no son susceptibles” a la penicilina, usualmente de laboratorios que usan el método de difusión en disco. Las cepas que muestran resultados reproducibles de CIMs sobre el límite de susceptibilidad de 0,12 µg/mL, o diámetros de zona < 24 mm, deben ser enviados a un laboratorio de referencia para su confirmación.

Estreptococos del grupo viridans

Los estreptococos del grupo viridans no son uniformemente susceptibles a la penicilina o ampicilina. Se deben realizar pruebas cuando estos organismos se encuentran en infecciones serias (eje., bacteriemia, endocarditis o abscesos piogénicos). La penicilina o la ampicilina deben ser probadas y reportadas rutinariamente en tales infecciones. Otros medicamentos que podrían ser analizados incluyen cefepime, cefotaxima o ceftriaxone. No se ha reportado resistencia a vancomicina en estreptococos del grupo viridans. Algunas especies que no son intrínsecamente resistentes a vancomicina podrían mostrar morfologías de colonias similares a aquellas de los estreptococos del grupo viridans. Estas incluyen *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Por lo tanto, antes de realizar las pruebas de susceptibilidad, la identificación de los estreptococos del grupo viridans debe ser confirmada mediante tinción de Gram y las pruebas bioquímicas apropiadas.

Sugerencias técnicas:

- El método de difusión por disco no es aceptable para analizar estreptococos del grupo viridans contra la penicilina porque los resultados no se correlacionan con los resultados de las pruebas de CIM. Sin embargo, la difusión por disco es aceptable para pruebas con cefepime, cefotaxima y ceftriaxone. Los criterios de interpretación constan en los Cuadros 2H M100 del NCCLS.
- La prueba de disco de oxacilina para detectar susceptibilidad a la penicilina en *Streptococcus pneumoniae* NO ES apropiada para otros *Streptococcus* spp.

Los procedimientos para *S. pneumoniae* son generalmente aplicables a otros *Streptococcus* spp. Una guía adicional para medir zonas de inhibición y límites de CIM está disponible en el Capítulo 10 sobre *S. pneumoniae*.

Métodos

El NCCLS tiene estándares específicos para las pruebas de *Streptococcus* spp no neumocócicos. Los métodos de rutina de difusión por disco y CIM son usados con las siguientes modificaciones.

Método	Medio	Incubación	
		Tiempo (h)	Atmósfera
Difusión de disco	SB-MHA ^a	20–24	CO ₂ (5%)
CIM Caldo	MH-LHB ^b	20–24	Aire ambiente
CIM Agar	SB-MHA	20–24	Aire ambiente ^c

^a Agar Mueller-Hinton conteniendo 5% de sangre de cordero.

^b Caldo Mueller-Hinton con ajuste de cationes conteniendo 2–5% (v/v) sangre de caballo lacada.

^c CO₂, si es necesario.

Interpretación de Resultados

Los cuadros 2H M100 del NCCLS (tanto en el capítulo de difusión por disco como en el capítulo de CIM) contienen criterios de interpretación para “*Streptococcus* spp. diferentes del *S. pneumoniae*.” Tomando en consideración que hay diferencias significativas en la susceptibilidad a los beta-lactámicos entre los estreptococos beta-hemolíticos y los estreptococos del grupo viridans existen conjuntos separados de criterios de interpretación para ambos grupos con los métodos de difusión por disco y de CIM. A continuación se presentan cuadros con ejemplos de la información contenida en los Cuadros 2 H.

Criterios de interpretación para grupos beta-hemolítico y viridans con prueba de difusión de disco

Medicamento	Contenido del disco	Interpretación de Diámetro de Zona (mm)		
		Resistente	Intermedia	Susceptible
Penicilina (grupo beta)	10 unidades	– ^a	–	≥ 24
Penicilina (grupo viridans)	10 unidades	NA ^b	NA	NA
Ceftriaxone (grupo beta)	30 (µg)	–	–	≥ 24
Ceftriaxone (grupo viridans)	30 (µg)	≤ 24	25–26	≥ 27

^a Debido a que todas las cepas han sido susceptibles otras interpretaciones no han sido desarrolladas.

^b NA, no aplicable. Los resultados de difusión de disco con penicilina no son confiables para estreptococos viridans.

Criterios de interpretación para grupos beta-hemolítico y viridans con prueba de CIM

Medicamento	Interpretación de CIM (µg/mL)		
	Susceptible	Intermedia	Resistente
Penicilina (grupo beta)	≤ 0,12	–	–
Penicilina (grupo viridans)	≤ 0,12	0,25–2	≥ 4
Ceftriaxone (grupo beta)	≤ 0,5	–	–
Ceftriaxone (grupo viridans)	≤ 1	2	≥ 4

Criterios de interpretación de difusión de disco y CIM para todos los *Streptococcus* spp.

Método/Medicamento	Contenido de disco (µg)	Interpretación		
		Resistente	Intermedia	Susceptible
Difusión de Disco				
Linezolid	30	– ^a	–	≥ 21
Vancomicina	30	–	–	≥ 17
CIM (µg/mL)				
Linezolid		≤ 2	–	–
Vancomicina		≤ 1	–	–

^a Debido a que las cepas resistentes a linezolid y vancomicina no han sido reconocidas, solo los límites de susceptible son enumerados para linezolid y vancomicina.

Para **colonias grandes de estreptococos beta-hemolíticos** (que contienen antígenos de los grupos A, B, C o G) use los criterios de interpretación para estreptococos beta-hemolíticos.

Para **estreptococos del grupo viridans y colonias pequeñas de cepas beta-hemolíticas** con antígenos de los grupos A, C, F o G, use los criterios de interpretación para estreptococos del grupo viridans.

Cuando los laboratorios encuentren un aislamiento que no da susceptible en una prueba con un medicamento clasificado en los criterios de interpretación como “solo susceptible” estos deben:

- Confirmar la identificación.
- Confirmar el resultado de susceptibilidad.
- Guardar cualquier aislamiento que no es susceptible y enviarlo a un laboratorio de referencia que realice un método de dilución de referencia del NCCLS.

Cuando se midan los diámetros de zona de un estreptococo en agar sangre, la fuente de luz debe ser reflejada, no transmitida. Es importante medir la zona de inhibición de crecimiento y no la zona de hemólisis alrededor del disco.

Como Reportar Resultados

Un aislamiento estreptocócico que es susceptible a la penicilina puede ser considerado susceptible a otros agentes beta-lactámicos (ver más abajo la lista.) Los laboratorios podrían añadir un comentario en el reporte que mencione los agentes beta-lactámicos que forman parte del vademécum de su institución.

Los estreptococos susceptibles a la penicilina también pueden ser considerados susceptibles a los siguientes agentes:

Ampicilina	Cefepime	Cefuroxime
Ampicilina-sulbactam	Cefotaxima	Cefalotina
Amoxicilina	Cefpodoxime	Cefapirina
Amoxicilina-ácido clavulánico	Cefprozil	Cefradina
Cefaclor	Ceftibutina	Imipenem
Cefazolina	Ceftizoxime	Loracarbef
Cefdinir	Ceftriaxone	Meropenem

Puesto que algunos médicos podrían no estar conscientes de la susceptibilidad universal de los estreptococos beta-hemolíticos a la penicilina, el reporte de laboratorio podría mencionarla.

El NCCLS sugiere añadir un comentario al reporte de laboratorio para enfatizar la necesidad de usar terapia combinada en el tratamiento de infecciones serias producidas por cepas del grupo viridans con resultados de CIMs de penicilina en el rango intermedio. Mire el siguiente ejemplo.

Fuente del espécimen: Sangre
Resultados: Streptococcus del grupo viridans

Agentes Antimicrobianos	CIM µg/mL	Interpretación
Ceftriaxone	0,5	S
Penicilina	1	I
Vancomicina	≤ 0,5	S

Comentario: los estreptococos que tienen resistencia “Intermedia” a penicilina podrían requerir terapia con un aminoglucósido para alcanzar acción bactericida.

Control de Calidad

Consulte el Capítulo 6 sobre Aseguramiento y Control de Calidad para obtener instrucciones específicas para pruebas de control de calidad para *Streptococcus* spp.

La cepa de control de calidad recomendada por el NCCLS es *S. pneumoniae* ATCC 49619. La CIM de penicilina para esta cepa se encuentra en el rango intermedio.

REVISIÓN

El lector ahora debe entender las pruebas de rutina de susceptibilidad antimicrobiana y las recomendaciones para reportar *Streptococcus* spp. no neumocócicos.

Recuerde:

- Usar los estándares más actualizados del NCCLS (M2 y M7) para las pruebas de *Streptococcus* sp. Los estándares M100 son actualizados anualmente y contienen los cuadros y sugerencias de reportes más recientes.
- Realizar una prueba de CIM de penicilina para estreptococos del grupo viridans aislados de sitios normalmente estériles (eje., aislamientos asociados con endocarditis)
- Investigar todos los resultados “no susceptible” a la penicilina en estreptococos beta-hemolíticos, puesto que la resistencia a la penicilina en este grupo no ha sido observada.

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

1. De los tres perfiles siguientes, seleccione cuál es la mejor opción para *S. agalactiae*, *S. pyogenes* y *S. mitis*.
2. Seleccione las condiciones que deben usarse para la prueba de microdilución CIM de estreptococos del grupo viridans.

	A	B	C
Clindamicina	S	S	S
Eritromicina	S	R	S
Penicilina	R	S	S
Tetraciclina	R	R	S
Vancomicina	S	S	S

Preparación del inóculo: Duración de incubación:

- | | |
|--|-------------|
| A. Suspensión de fase logarítmica (crecimiento hasta turbidez) | A. 16- 20 h |
| B. Suspensión directa de colonias | B. 20-24 h |

Atmósfera de incubación:

- | | |
|------------------|--------------------|
| A. Aire ambiente | B. CO ₂ |
|------------------|--------------------|

3. Su laboratorio aisló *S. agalactiae* de un espécimen vaginal/rectal de una mujer embarazada. El médico solicitó que se realicen pruebas de susceptibilidad en este aislamiento porque la paciente es alérgica a la ampicilina. ¿Qué medicamentos adicionales probaría y reportaría?
 - A. Clindamicina, eritromicina
 - B. Ciprofloxacina, eritromicina
 - C. Eritromicina, tetraciclina
 - D. Eritromicina, vancomicina
 - E. Vancomicina

4. Un médico le pide que realice una prueba de susceptibilidad a la penicilina en un aislamiento de *S. pyogenes*. ¿Cuál sería la respuesta más adecuada?
 - A. Prueba de difusión por disco.
 - B. Prueba de CIM.
 - C. Explicar al médico que todos los *S. pyogenes* son susceptibles a penicilina y por tanto el laboratorio no realiza la prueba de esta especie en forma rutinaria.

5. ¿Cuál sería la respuesta más adecuada si encuentra un estreptococo del grupo viridans para el cual la CIM de vancomicina fue $> 32 \mu\text{g/mL}$?
 - A. Repetir la prueba de susceptibilidad a vancomicina usando el método de difusión por disco.
 - B. Repetir la prueba de susceptibilidad a vancomicina usando el mismo método de CIM que en la prueba inicial.
 - C. Confirmar la identificación del aislamiento.
 - D. Repetir la prueba de susceptibilidad a vancomicina usando el mismo método de CIM y confirmar la identificación del aislamiento.

6. El médico en el estudio de caso solicitó una prueba de susceptibilidad a la penicilina para estreptococo del grupo viridans aislado de los cultivos de sangre de la paciente. ¿Cuál sería la respuesta más adecuada a este pedido?
 - A. Prueba de difusión por disco.
 - B. Prueba de CIM.
 - C. Explicar al médico que todos los estreptococos del grupo viridans son susceptibles a penicilina. Por tanto, el laboratorio no realiza la prueba de esta especie en forma rutinaria.

IV

Organismos Gram Negativos

12

Enterobacteriaceae

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de :

- Discutir una estrategia práctica para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de *Enterobacteriaceae* en su laboratorio.
- Describir dónde encontrar recomendaciones para pruebas de difusión por disco y CIM para *Enterobacteriaceae*, incluyendo preparación del inóculo, medio de cultivo adecuado, tiempo y condiciones de incubación.
- Modificar métodos de prueba de rutina para detectar y confirmar la producción de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) en *Enterobacteriaceae*.
- Comparar y diferenciar entre las beta-lactamasas inducibles y las BLEEs.
- Describir una estrategia para realizar antibiogramas para *Salmonella* y *Shigella* spp. incluyendo los agentes antimicrobianos apropiados para pruebas y los reportes de resultados.

ANTECEDENTES:

La Familia de las *Enterobacteriaceae* contiene muchas especies de bacilos gram-negativos, no formadores de esporas y que son aeróbicos o anaeróbicos facultativos. Aproximadamente el 50 por ciento de las bacterias de importancia en clínica aisladas en el laboratorio de microbiología son *Enterobacteriaceae* y 20 especies de *Enterobacteriaceae* son responsables de la mayoría de los aislamientos en muestras clínicas. Las Bacterias de la familia de las *Enterobacteriaceae* forman parte de la flora gastrointestinal normal; sin embargo, varias especies pueden causar enfermedad gastrointestinal.

Uno de los tipos más comunes de infecciones causadas por *Enterobacteriaceae* en el área ambulatoria es la cistitis aguda no complicada, en la cual la *Escherichia coli* es el patógeno predominante. Entre pacientes hospitalizados, *Enterobacteriaceae* por lo general causan infecciones y no es infrecuente que los brotes sean el resultado de la diseminación de cepas de *Enterobacteriaceae* con resistencia múltiple a los medicamentos.

CASO DE ESTUDIO:

Una mujer de 68 años de edad fue ingresada a la unidad de terapia intensiva quirúrgica (UTIQ) luego de la reparación de un aneurisma aórtico. En el sexto día del postoperatorio, ella tuvo fiebre de (38,3°C). El médico ordenó dos cultivos de san-

gre y le inició a la paciente terapia con cefotaxima y vancomicina. En las próximas seis horas, la paciente mostró una ligera mejoría, pero permaneció febril.

En el segundo día de fiebre, ambos cultivos de sangre fueron positivos y una tinción Gram reveló bacilos gram-negativos. Este reporte y el hecho que la paciente permaneció febril indujo al médico a solicitar dos cultivos de sangre adicionales. La vancomicina se discontinuó porque los bacilos gram-negativos son típicamente resistentes a vancomicina. Se añadió gentamicina al régimen terapéutico. El siguiente reporte de laboratorio demostró que el bacilo gram-negativo era *Enterobacter cloacae*.

Reporte de Laboratorio

Fuente del espécimen: sangre (obtenida en el día 1)

Resultados: *Enterobacter cloacae*

Ampicilina	R
Cefazolina	R
Cefotaxima	S
Ciprofloxacina	S
Gentamicina	S
Imipenem	S
Piperacilina	R
Trimethoprim- sulfamethoxazol	R

Luego de la administración de gentamicina, la temperatura se redujo a valores normales y la paciente tuvo una marcada mejoría.

Los cultivos de sangre obtenidos en el segundo día fueron positivos para *E. cloacae*.

¿Observa usted alguna diferencia en los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *E. cloacae* entre el segundo grupo de cultivos de sangre comparado con el grupo inicial?

Reporte de Laboratorio

Fuente del espécimen: sangre (obtenida en el día 2)

Resultados: *Enterobacter cloacae*

Ampicilina	R
Cefazolina	R
Cefotaxima	R
Ciprofloxacina	S
Gentamicina	S
Imipenem	S
Piperacilina	R
Trimethoprim- sulfamethoxazol	R

Luego de completar este capítulo usted será capaz de explicar lo que pasó.

Beta-Lactamasas en Enterobacteriaceae

Como se muestra en el siguiente diagrama los miembros de la familia de las *Enterobacteriaceae* producen muchos tipos diferentes de beta-lactamasas. Cada tipo de beta-lactamasa en este diagrama se describe a continuación. Para mayor infor-

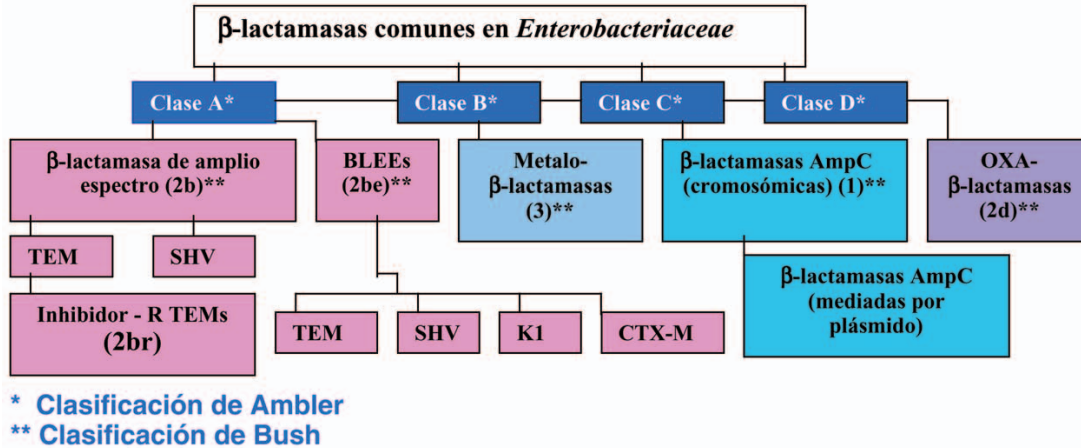


Figura 12.1—Una prueba confirmatoria positiva de difusión por disco para producción de BLEE

mación sobre la clasificación global de las beta-lactamasas, incluyendo las Clases A-D, consultar el Capítulo 2 Beta-lactamasas de este manual.

Beta-lactamasa de amplio espectro (Clase 2b):

Muchas beta-lactamasas conocidas están agrupadas en el Grupo 2b según la clasificación de Bush, incluyendo las enzimas básicas mediadas codificadas por plásmidos TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Estas enzimas son inhibidas por el ácido clavulánico. A medida que se incrementa el nivel de expresión de las beta lactamasas de amplio espectro, aparece la resistencia a otros beta lactámicos como cefalotina y cefazolina.

- TEM: La TEM-1 es responsable por la resistencia a la ampicilina de *E. coli* y ciertas otras *Enterobacteriaceae*.
 - Inhibidor-R TEMs (2br): Algunos de los genes que contienen el código de beta-lactamasa TEM sufren mutaciones que cambian la secuencia de los aminoácidos de las enzimas. Estas nuevas enzimas son inhibidas por el ácido clavulánico, pero en un grado mucho menor que la beta lactamasa original TEM-1.
- SHV: La SHV-1 y enzimas similares producidas por *K. pneumoniae* confieren resistencia a la ampicilina y penicilinas relacionadas.

BLEEs (Clase 2be): Las mutaciones de los genes que codifican beta lactamasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 se han vuelto comunes en aislamientos de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y otros bacilos gram-negativos incluyendo *Burkholderia cepacia*, *Capnocytophaga ochracea*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella morganii*, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Serratia marcescens* y *Shigella dysenteriae*. Estas mutaciones resultan en la producción de beta-lactamasas conocidas como beta lactamasas de espectro extendido o BLEEs.

Propiedades de las BLEEs: Las BLEEs hidrolizan todas las penicilinas, aztreonam y todas las cefalosporinas (pero no las cefamicinas eje. cefoxitina y cefotetan). Los genes de BLEE se encuentran comúnmente en plásmidos transmisibles que por lo general codifican otros determinantes de resistencia (eje., aminoglucósidos o trimethoprim/sulfamethoxazol). Las BLEEs son inhibidas por inhibidores de la beta lactamasa (eje., ácido clavulánico).

Los tipos de BLEEs reconocidos hasta el 2004 son:

- TEM: Hay aproximadamente 150 tipos de BLEEs TEM.
- SHV: Hay aproximadamente 50 tipos de BLEEs SHV.
- K1: Cepas de *Klebsiella oxytoca* producen la beta lactamasa K1 que confiere resistencia a la ampicilina. Las cepas hiper-productoras de la enzima K1 también son resistentes a otras penicilinas, cefuroxima, aztreonam y ceftriaxone, pero son susceptibles a ceftazidima. Las CIMs de cefotaxima se encuentran moderadamente elevadas.
- CTX-M: Las enzimas CTX-M codificadas por plásmidos son similares a las enzimas K1 y se han encontrado en *E. coli*, *K. pneumoniae* y una variedad de otras *Enterobacteriaceae*. Los aislamientos que producen CTX-M son típicamente resistentes a cefotaxima y algunos tienen susceptibilidad reducida a los inhibidores de las beta lactamasas.

Metalo-beta-lactamasas (Clase 3)

La mayoría de metalo-beta-lactamasas requieren zinc u otros cationes. Estas enzimas son capaces de hidrolizar carbapenemes (eje. imipenem, meropenem) y otros beta lactámicos (excepto los monobactames).

Las metalo-beta-lactamasas no son inhibidas por ácido clavulánico y con poca frecuencia se encuentran en las *Enterobacteriaceae*.

Beta-lactamasas AmpC (cromosómicas) (Clase 1)

Uno de los grupos más difundidos de beta-lactamasas es el de las enzimas AmpC. Éstas están codificadas por genes *ampC* que se encuentran típicamente en los cromosomas de la mayoría de *Enterobacteriaceae*. Casi todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (con excepción de *Salmonella* spp. y *Klebsiella* spp.) producen bajos niveles de enzimas de Amp C. Sin embargo, en algunas especies como *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii* la presencia de beta-lactámicos induce la producción de niveles muchos más altos de beta-lactamasas AmpC. Las especies con niveles más altos de producción de AmpC son resistentes a ampicilina y cefalosporinas de primera generación. No todas las especies de bacterias gram-negativas poseen un gene *ampC* inducible. La expresión de *ampC* en *E. coli* y *Shigella* spp. es constitutivamente baja, no inducible, y bajo cualquier circunstancia se producen sólo pequeñas cantidades de la enzima. Los antibióticos beta-lactámicos varían de inductores muy fuertes a no-inductores de beta-lactamasas AmpC.

Información adicional:

- Inducción de las beta-lactamasas AmpC: la cefoxitina y los carbapenemes (eje. imipenem y meropenem) pueden inducir la producción de muy altos niveles de beta-lactamasas AmpC.

Lista de *Enterobacteriaceae* que producen beta-lactamasas inducibles:

<i>C. freundii</i> .	<i>S. marcescens</i>
<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Hafnia alvei</i>
<i>M. organii</i>	<i>P. vulgaris</i>
<i>Providencia</i> spp	<i>Proteus penneri</i>

Beta-lactamasas cromosómicas y su expresión en *Enterobacteriaceae*

Organismo	Nombre	Modos de Expresión			
		Inducible	Constitutiva		
			Mínima	Moderada	Alta
<i>E. coli</i>	AmpC	–	N		R
<i>Shigellae</i>	AmpC	–	N		R
<i>Enterobacter</i> spp.	AmpC	N	R		F
<i>C. freundii</i>	AmpC	N	R		F
<i>M. organii</i>	AmpC	N	–		F
<i>Providencia</i> spp.	AmpC	N	R	–	R
<i>Serratia</i> spp.	AmpC	N		–	F
<i>K. pneumoniae</i>	SHV-1			N	R*
<i>K. oxytoca</i>	K-1		–	N	F
<i>Proteus mirabilis</i>			N		–
<i>Proteus vulgaris</i>	Grupo 2e	N	–	–	R

N Modo de producción Normal, típica de la especie.

F Encontrada Frecuentemente, variable entre los países, hospitales y unidades, pero observada en 10 al 50% de los aislamientos según las investigaciones más recientes.

R Rara, observada en menos del 10% de aislamientos.

– Solo reportes aislados o desconocidos.

Producción **mínima** significa que la enzima es detectable pero no causa resistencia significativa; **moderada** significa que la enzima contribuye a la resistencia a los buenos substratos; **alta** significa grandes niveles de la enzima—hasta un 3% del total de la proteína celular en ciertas *Enterobacter*—capaz de conferir resistencia hasta a los substratos más complejos.

* Frecuente cuando la enzima SHV-1 es mediada por plásmidos.

Adaptado de Livermore, D. 1995. Clin. Microbiol Rev. 8:564.

La mutación del gene *ampC*:

El gene *ampC* en las *Enterobacteriaceae* puede sufrir una mutación que resulta en una producción aumentada de beta-lactamasa. Esta es independiente de la exposición a un agente inductor y generalmente ocurre en una de 10^6 a 10^8 células. La nueva célula resistente con frecuencia no sobrevive entre una extensa población de células susceptibles a menos que haya presión selectiva, como terapia antimicrobiana prolongada, que favorece la proliferación de mutantes resistentes.

Para revisar los procesos de inducción y selección consulte el Capítulo 1 Modos de Acción de los Antimicrobianos de este manual.

Beta-lactamasas AmpC (codificadas por plásmidos)

Los genes *ampC* han sido descubiertos en plásmidos de varias especies de *Enterobacteriaceae*. Estos genes *ampC* son probablemente derivados de genes cromosómicos *ampC* de *C. freundii*, *E. Cloacae* y *M. organii*.

Estos aislamientos producen grandes cantidades de beta-lactamasa AmpC, confiriendo resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido, cefamicinas, penicilinas y combinaciones de inhibidores de beta-lactamasa. La expresión es usualmente de alto nivel y constitutiva.

OXA-beta-lactamasas (2d)

Las OXA beta-lactamasas, originalmente detectadas en *P. aeruginosa*, hidrolizan la oxacilina y la cloxacilina. Estas también producen resistencia de bajo nivel a

las penicilinas y muchas no son bloqueadas por los inhibidores de beta-lactamasa. Otras OXA beta-lactamasas son BLEEs y carbapenemasas.

Resistencia—Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos (eje., amikacina, gentamicina, tobramicina) son generalmente activos contra *Enterobacteriaceae*

La resistencia a los aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae*:

- Usualmente es mediada por la producción de enzimas que añaden un grupo acetil, adenil o fosfato al aminoglucósido de tal forma que éste ya no sea capaz de unirse al ribosoma.
- Raramente se debe a una modificación de los ribosomas de tal manera que haya una afinidad reducida para unirse al aminoglucósido (esto sólo afecta a la espectinomicina).

Muchos de los genes de resistencia a los aminoglucósidos están en plásmidos y transposones.

Fluoroquinolonas

La incidencia de resistencia a las fluoroquinolonas en *Enterobacteriaceae* varía mucho de un país a otro. Actualmente es poco común en los Estados Unidos; pero su frecuencia está aumentando, especialmente en *E. coli*.

La resistencia a las fluoroquinolonas es independiente de la resistencia a otras clases de agentes antimicrobianos. Ocasionalmente es posible encontrar una cepa

Probabilidad de varios perfiles de aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae* en los Estados Unidos^a

Probabilidad	Gentamicina	Tobramicina	Amikacina
Común	R	S	S
Común	R	R	S
Poco común	S	R	R
Poco común	R	S	R
Rara	R	R	R
Improbable ^b	S	S	R

^a La frecuencia de fenotipos resistentes en cada país puede ser muy diferente. Por ejemplo, en Argentina el fenotipo resistente más común es el catalogado en este cuadro como “Raro” (comunicación personal, Dr. Marcelo Galas).

^b Probablemente es un error.

E. coli que es susceptible a todos los agentes de su panel excepto las fluoroquinolonas (eje., ciprofloxacina, levofloxacina, etc.).

Estrategia de Prueba

El Cuadro 1 del documento M100 del NCCLS sugiere medicamentos para pruebas y reportes contra *Enterobacteriaceae*.

Las *Enterobacteriaceae* pueden presentar una variedad de perfiles de susceptibilidad. Por lo tanto, las pruebas de susceptibilidad deben ser realizadas en todos los aislamientos clínicos significativos dentro de este grupo de organismos.

Estrategia de Prueba – BLEEs

El tratamiento de la bacteriemia causada por organismos productores de BLEE con cefalosporinas de espectro extendido (eje., ceftazidima) puede resultar en un fracaso clínico. Por ende, es imperativo detectar y confirmar la presencia de BLEEs en todas las *E. coli* y *Klebsiella* spp.

El NCCLS no ha abordado la cuestión de la detección de BLEEs en otras especies aparte de *E. coli* y *Klebsiella* spp. En un extenso estudio de *Enterobacteriaceae* no *E. coli* y no *Klebsiella* en pacientes de los Estados Unidos se encontró que la producción de BLEE es relativamente rara en estos organismos. En un análisis preliminar de BLEE en 690 aislamientos, 355 fueron positivos, pero las pruebas de confirmación fueron positivas sólo en 15 aislamientos (2,2%). Los autores concluyeron que la detección de BLEE en *Enterobacteriaceae* no *E. coli* y no *Klebsiella* no es necesario en los Estados Unidos. (Schwaber, M.J. et al., J. Clin. Microbiol. 2004. Vol. 42 (1) p. 294-298.) Sin embargo, la situación podría ser muy diferente en otras regiones. Es necesario realizar un estudio similar con aislamientos de toda América Latina.

La infecciones de vías urinarias no complicadas causadas por *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE pueden ser tratadas con beta-lactámicos de espectro extendido debido a la alta concentración del medicamento que se alcanza en la orina. Sin embargo, la sepsis urinaria causada por cepas productoras de BLEE no debe ser tratada con agentes beta-lactámicos de espectro extendido.

En la actualidad, el NCCLS sugiere (en el documento M100) que la decisión de realizar análisis para detectar la presencia de BLEE en todos los aislamientos de orina debe basarse en las políticas institucionales.

Métodos de prueba

El NCCLS tiene estándares específicos para pruebas de *Enterobacteriaceae*. Se utilizan métodos de rutina de difusión por disco y CIM, incluyendo preparación estándar del inóculo, inoculación y procedimientos de incubación. Existen algunas modificaciones al procedimiento estándar cuando se realizan pruebas para BLEEs. Estas se discutirán más adelante.

Cuando se use un sistema comercial, se debe verificar si hay alguna limitación para reportar ciertas combinaciones de agente antimicrobiano/organismo.

Métodos—Como Interpretar los Resultados

El Cuadro 2A del documento M100 del NCCLS, tanto en la sección de difusión por disco como de CIM, contiene criterios de interpretación para *Enterobacteriaceae*.

El NCCLS enfatiza el desarrollo potencial de resistencia (y sugerencias para repetir las pruebas) entre las *Enterobacteriaceae* con el siguiente comentario:

“*Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia* spp. pueden desarrollar resistencia durante una terapia prolongada con cefalosporinas de tercera generación. Por lo tanto, los aislamientos que en un inicio son susceptibles pueden volverse resistentes dentro de tres a cuatro días de iniciada la terapia. Puede ser necesario realizar pruebas en aislamientos repetidos.” Se puede añadir un comentario que refleje esta inquietud en el reporte del paciente.

Además de la producción de beta-lactamasa, cambios en las porinas podrían contribuir a la resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (espectro extendido) y las cefamicinas.

Métodos—Pruebas BLEE

Los estándares del NCCLS describen tanto las pruebas de difusión por disco como de CIM para detectar BLEEs en las especies de *E. coli* y *Klebsiella*.

Pruebas de Detección “Tamizaje” de BLEE

Para identificar potencial productoras de BLEE use los nuevos límites de difusión por disco (ver a continuación el Cuadro 1) y CIM (ver a continuación el Cuadro 2) para aztreonam, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima y ceftriaxone. Una cepa productora de BLEE podría hidrolizar uno o más de estos agentes. Probar varios de estos agentes incrementará la sensibilidad de detección de la variedad de BLEEs que podrían encontrarse.

Prueba de Detección “Tamizaje” para determinar presencia de BLEE por Difusión por Disco

Realice la prueba estándar de difusión por disco de acuerdo con las recomendaciones del NCCLS utilizando las condiciones de prueba y contenido de disco especificadas para *Enterobacteriaceae*.

Interpretación: Si un aislamiento produce un halo de inhibición menor o igual al diámetro del halo especificado en la tabla para uno o más de los agentes, se considera como potencial productor de BLEE.

Cuadro 1. Criterios de interpretación de difusión por disco para detectar potenciales productoras de BLEE

Antimicrobiano	Límites de difusión por disco (mm)
Aztreonam	≤27
Cefotaxima	≤27
Cefpodoxima	≤17
Ceftazidima	≤22
Ceftriaxone	≤25

Prueba para determinar presencia de Detección “Tamizaje” de BLEE por CIM

Realice pruebas de CIM de acuerdo con las recomendaciones del NCCLS para *Enterobacteriaceae*.

Interpretación: Si la CIM es ≥8 µg/mL para cefpodoxima y/o la CIM es ≥ 2 µg/mL para uno o más de los otros cuatro agentes, se considera una potencial productora de BLEE.

Cuadro 2. Criterios de interpretación de CIM (µg/mL) para detectar potenciales productoras de BLEE

Antimicrobiano	Límite de CIM (µg/mL)
Aztreonam	≤ 2
Cefotaxima	≤ 2
Cefpodoxima	≤ 8
Ceftazidima	≤ 2
Ceftriaxone	≤ 2

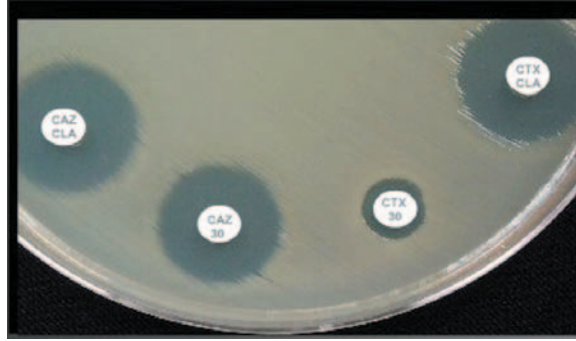


Figura 12.2—Una prueba confirmatoria positiva de difusión por disco para producción de BLEE

Pruebas confirmatorias de BLEE

Las potenciales productoras de BLEE son analizadas tanto con cefotaxima y ceftazidima solas en combinación con ácido clavulánico. Si el aislamiento produce una BLEE, el ácido clavulánico inhibirá la actividad de la enzima y restaurará la actividad de la cefotaxima o la ceftazidima. Se puede usar un método de difusión por disco (ver a continuación Cuadro 3) o de CIM (ver a continuación Cuadro 4).

Interpretación: Un incremento ≥ 5 mm en el diámetro del halo para cefotaxima o ceftazidima cuando se prueban en combinación con ácido clavulánico, comparado con el diámetro del halo cuando se prueba sin ácido clavulánico, confirma la producción de BLEE.

Cuadro 3. Prueba confirmatoria por disco para detectar potenciales productoras de BLEE

Antimicrobiano	Contenido del disco
Cefotaxima	30 μg
Cefotaxima	30 μg + ácido clavulánico 10 μg
Ceftazidima	30 μg
Ceftazidima	30 μg + ácido clavulánico 10 μg

Realice pruebas de CIM confirmatorias para bacterias productoras de BLEE de acuerdo con las recomendaciones del NCCLS para *Enterobacteriaceae* e incluya el rango de concentraciones (diluciones dobles) especificadas a continuación.

Interpretación: La producción de BLEE es confirmada cuando hay una disminución ≥ 3 diluciones en la CIM ya sea de cefotaxima o ceftazidima cuando se prueban en combinación con ácido clavulánico, comparado con la CIM cuando se prueba sin ácido clavulánico.

Cuadro 4. Prueba confirmatoria por CIM para bacterias productoras de BLEE

Antimicrobiano	Rangos de concentración $\mu\text{g/mL}$
Cefotaxima	0,25–64
Cefotaxima/ácido clavulánico	0,25/4–64/4
Ceftazidima	0,25–128
Ceftazidima/ácido clavulánico	0,25/4–128/4

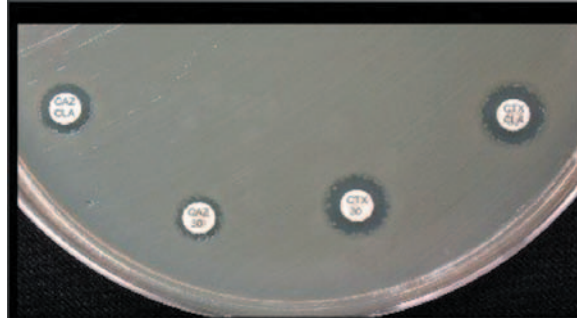


Figura 12.3—Una prueba confirmatoria negativa de difusión por disco para producción de BLEE

Métodos—Resultados de la prueba de BLEE

Mire Fig. 12.2, la fotografía de una prueba negativa de difusión por disco confirmatoria de producción de BLEE que se realizó en una *E. coli*. Los discos con ácido clavulánico no muestran actividad aumentada comparados con los discos con sólo cefotaxima o ceftazidima.

Este resultado negativo podría deberse a una o más de las siguientes razones:

- Producción de beta-lactamasa AmpC codificada por plásmido
- Sobre expresión de beta-lactamasa AmpC cromosómica
- Presencia de una combinación de mecanismos resistencia:
- BLEE + inhibidor resistente TEM o SHV
- BLEE + beta-lactamasa AmpC mediada por plásmido
- BLEE + mutación de porina

Como reportar resultados—Pruebas de BLEE

Las bacterias productoras de BLEE a veces aparecen como susceptibles a algunas cefalosporinas, penicilinas y aztreonam cuando se utilizan los límites tradicionales para la interpretación de resultados. Sin embargo, los datos clínicos sugieren que las infecciones causadas por aislamientos productores de BLEE no responden a estos agentes.

El NCCLS menciona que para las bacterias productoras de BLEE “la prueba de interpretación debe ser reportada como resistente a todas las penicilinas, cefalosporinas (mas no las cefamicinas) y aztreonam.

Sugerencia técnica: Recuerde que las cefamicinas incluyen cefoxitina y cefotetan.

Como reportar resultados—Pruebas de BLEE

Se debe emitir un reporte preliminar para aislamientos de *E. coli* o *Klebsiella* spp. que tienen una prueba de presencia de BLEE positiva, mientras se hallen pendientes los resultados confirmatorios. Los resultados para cefalosporinas (mas no las cefamicinas), penicilinas y aztreonam no deben ser reportados como susceptibles en una cepa potencialmente productora de BLEE. Para facilitar el reporte, una nota puede añadirse al reporte preliminar según se muestra a continuación.

Reporte de Laboratorio

Fuente: sangre

Resultados: *Klebsiella pneumoniae*

Comentario: Esta cepa de *K. pneumoniae* es una potencial productora de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE). Los resultados para cefalosporinas de espectro extendido y penicilinas adicionales están pendientes.

	CIM (µg/mL)	Interpretación
Amikacina	8	S
Ampicilina	>32	R
Cefazolina	>32	R
Cefoxitina	2	S
Ceftazidima	>32	R
Ciprofloxacina	0,5	S
Gentamicina	>16	R
Imipenem	≤ 0,25	S
Piperacilina-tazobactam	16	S
Tobramicina	>16	R
Trimethoprim-sulfamethoxazol	>4/76	R

Reporte de Laboratorio

Fuente: sangre

Resultados: *Klebsiella pneumoniae*

Comentario: Las pruebas confirmatorias demuestran que esta cepa de *K. pneumoniae* es productora de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE). Las interpretaciones han sido modificadas.

	CIM (µg/mL)	Interpretación
Amikacina	8	
Ampicilina	>32	R
Cefazolina	>32	R
Cefotaxima		R*
Cefoxitina	2	S
Ceftazidima		R*
Ciprofloxacina	0,5	S
Gentamicina	>16	R
Imipenem	≤ 0,25	S
Piperacilina-tazobactam	16	S
Tobramicina	>16	R
Trimethoprim- sulfamethoxazol	>4/76	R

Si los resultados de las pruebas confirmatorias son positivos, el reporte debe mencionar claramente que el aislamiento es productor de BLEE. Las cepas productoras de BLEE deben ser reportadas como resistentes a todas las penicilinas, cefalosporinas (mas no las cefamicinas) y aztreonam sin importar el resultado *in vitro*.

Si la prueba confirmatoria de BLEE es negativa, los resultados de todas las pruebas son reportadas sin modificación y un comentario adicional debe añadirse al reporte final:

Comentario: Esta *Klebsiella pneumoniae* NO es una productora de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE). Resultados definitivos. Prueba completada.

Prueba de BLEE – puntos para recordar

- La producción de BLEE es más comúnmente asociada con *E. coli* y *Klebsiella* spp. Desde enero de 2005 *P. mirabilis* se añadirá al algoritmo del NCCLS para *E. coli* y *Klebsiella* spp. Las pruebas de producción de BLEE no han sido estandarizadas en otras especies.
- La actividad de los beta-lactámicos de espectro extendido, incluyendo cefotaxima y ceftazidima, contra las bacterias productoras de BLEE es restaurada en presencia de ácido clavulánico.
- Las bacterias productoras de BLEE son por lo general resistentes a aminoglucósidos, fluoroquinolonas y trimethoprim-sulfamethoxazol.
- Las bacterias productoras de BLEE deben ser reportadas como resistentes a todas las penicilinas, cefalosporinas (mas no cefoxitina o cefotetan) y aztreonam sin importar el resultado *in vitro*.

Comparación entre beta-lactamasas AmpC, inducible y de espectro extendido:

Resumen de las Características de las Beta-lactamasas

Característica	<i>AmpC</i> ^a (mediada por plásmido)	Inducible	BLEE
Ubicación de los genes de resistencia	Plásmido	Cromosoma (<i>ampC</i>)	Plásmido o cromosoma
Más comúnmente encontrada en	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp.	<i>Enterobacter</i> spp., <i>C. freundii</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>M. organii</i> , <i>Providencia</i> ssp., <i>Proteus rettgeri</i>	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp.
Inhibida por ácido clavulánico	No	No	Sí
¿El organismo huésped es generalmente susceptible a cuáles medicamentos beta-lactámicos?	Carbapenemes	Carbapenemes	Cefamicinas (cefotetan y cefoxitina) y carbapenemes
¿El organismo huésped es generalmente resistente a cuáles medicamentos beta-lactámicos?	Todos los beta-lactámicos incluyendo cefamicinas pero excluyendo carbapenemes	Todos los beta-lactámicos incluyendo cefamicinas pero excluyendo carbapenemes	Todas las cefalosporinas, penicilinas y aztreonam
Notas en los reportes	Reportar los resultados como se obtuvieron	Reportar los resultados como se obtuvieron	Reportar como resistente a todas las cefalosporinas, penicilinas y aztreonam

Otras Enterobacteriaceae—*Salmonella* y *Shigella* spp.

Hay tres comentarios importantes en los cuadros del NCCLS para *Enterobacteriaceae* que pertenecen al reporte de resultados de *Salmonella* spp. y/o *Shigella* spp.

“Para aislamientos fecales de *Salmonella* y *Shigella* spp., sólo se debe probar y reportar rutinariamente ampicilina, una fluoroquinolona y trimetoprima-sulfamethoxazol. Además, se debe probar y reportar cloranfenicol y una cefalosporina de tercera generación en aislamientos de *Salmonella* spp.”

“Los aislamientos extraintestinales de *Salmonella* también deben ser analizados para descartar resistencia a ácido nalidíxico. En aislamientos que dan susceptible a las fluoroquinolonas y resistente a ácido nalidíxico, el médico debe ser informado que el aislamiento podría no ser erradicado mediante el tratamiento con fluoroquinolonas. Se recomienda una consulta con un especialista en enfermedades infecciosas.”

“Advertencia: Para *Salmonella* spp. y *Shigella* spp., los aminoglucósidos y las cefalosporinas de 1^{ra} y 2^{da} generación podrían aparecer activos in vitro pero no son efectivos clínicamente y no deben ser reportados como susceptible.”

Control de Calidad

Revise el Capítulo 6 AC/CC de este manual para obtener instrucciones específicas sobre pruebas de CC para *Enterobacteriaceae*.

Las cepas de control de calidad recomendadas por el NCCLS para pruebas de rutina de difusión por disco y de CIM son:

- *P. aeruginosa* ATCC 27853
- *E. coli* ATCC 25922
- *E. coli* ATCC 35218 (para combinaciones de beta-lactámicos/inhibidor de beta-lactamasa)

Las cepas de control de calidad recomendadas por el NCCLS para detección de BLEE y pruebas confirmatorias son:

- *E. coli* ATCC 25922
- *K. pneumoniae* ATCC 700603 (cepa productora de BLEE)

COMENTARIO AL CASO DE ESTUDIO

Ahora usted debe ser capaz de explicar porque el aislamiento inicial de la paciente de *E. cloacae* fue susceptible a cefotaxima y porque el aislamiento de *E. cloacae* del segundo día fue resistente a cefotaxima.

¿Cuál es la explicación más probable?

- A. La paciente se infectó con una nueva cepa de *E. cloacae*.
- B. El aislamiento desarrolló resistencia durante la terapia.
- C. El resultado de susceptibilidad de cefotaxima fue un error.

Respuesta correcta: B. La *E. cloacae*, inicialmente susceptible a cefotaxima, es ahora resistente. La paciente permaneció febril mientras recibía cefotaxima y vancomicina que sugiere que el aislamiento desarrolló resistencia a cefotaxima.



Figura 12.4—Una Prueba de los aislamientos del cultivo de sangre inicial muestra una grande zona alrededor del disco de cefotaxima

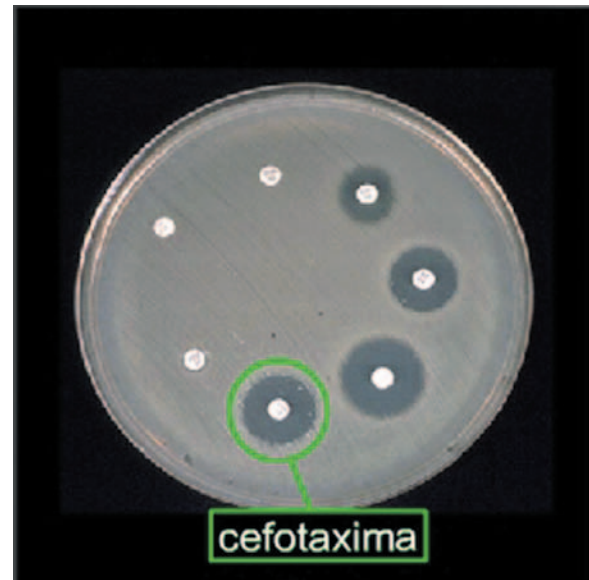


Figura 12.5—Una Prueba de los aislamientos del cultivo de sangre tomada en el día 2 muestra una zona mas pequeña alrededor del disco de cefotaxima



Figura 12.6—Un acercamiento de la zona de cefotaxima vista en la Figura 12.4. Note las colonias dentro de la zona; no las ignore cuando este midiendo zonas.



Figura 12.7—Prueba de colonias de dentro de la zona de la Figura 12.5 después de haber sido subcultivadas y probadas de nuevo. No hay zona alrededor del disco de cefotaxima.

Mire las siguientes fotografías de las pruebas de difusión por disco en los aislamientos de *E. cloacae*. (Note: los círculos verdes de criterio permanecen constantes en cada fotografía.)

Las colonias dentro del halo por lo general representan subpoblaciones resistentes. Revise el Capítulo 4 Difusión por Disco de este manual para obtener sugerencias de cómo proceder con estas colonias internas.

A veces con las pruebas de microdilución en caldo de CIM de beta-lactámicos de espectro extendido, los organismos con subpoblaciones resistentes no evidencian crecimiento en todos los pozos consecutivos.

REVISIÓN

Ahora debe tener conocimiento sobre las recomendaciones para pruebas y reportes de rutina de susceptibilidad antimicrobiana para *Enterobacteriaceae*.

Recuerde:

- Usar los estándares más actualizados del NCCLS: M2, M7 y M100 para obtener las instrucciones para pruebas de *Enterobacteriaceae*.
- Reportar todas las penicilinas, cefalosporinas (mas no cefamicinas) y aztreonam como resistentes para *E. coli* y *Klebsiella* spp. confirmadas como productoras de BLEE a pesar de los resultados *in vitro*.
- Abstenerse de reportar aminoglucósidos y cefalosporinas de primera y segunda generación en resultados de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp.
- Analizar *Salmonella* spp. extraintestinal con ácido nalídixico para detectar susceptibilidad disminuida a las fluoroquinolonas.

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

1. ¿Cuál de las siguientes especies no produce beta-lactamasas inducibles?
 - A. *C. freundii*
 - B. *E. coli*
 - C. *E. cloacae*
 - D. *M. morgani*
 - E. *S. marcescens*
2. Seleccione el organismo/mecanismos de resistencia listados a continuación que sean más compatibles con los perfiles de susceptibilidad A, B, C y D.
 1. *E. coli* productora de AmpC mediada por plásmido
 2. *K. oxytoca* hiper productora de K1
 3. *K. pneumoniae* productora de BLEE
 4. *E. coli* productora de TEM
3. Conteste a las siguientes frases Verdadero o Falso.
 - A. La TEM-1 es una enzima BLEE.
 - B. Los aislamientos productores de BLEE son usualmente susceptibles a cefoxitina.
 - C. Las metalo beta-lactamasas son abundantes en *Enterobacteriaceae*.
 - D. Las BLEE sólo se encuentran en *E. coli* y *Klebsiella* spp.
 - E. Las AmpC beta-lactamasas son inhibidas por el ácido clavulánico.
4. ¿Cuál de las siguientes condiciones de prueba es correcta para analizar *Enterobacteriaceae* mediante difusión por disco?

Preparación del inóculo

 - A. Sólo suspensión de fase log
 - B. Suspensión directa de colonias o fase log

Duración de la incubación

 - A. 16-18 horas
 - B. 20-24 horas
5. Usted tiene cinco grupos de resultados de pruebas de tamizaje de BLEE por difusión por disco de cinco aislamientos de *E. coli* probados tanto con cefpodoxima

como con ceftazidima. ¿Cuál o cuáles de estos son potenciales productores de BLEE? Seleccione todas las que apliquen.

Aislamientos <i>E. coli</i>	Cefpodoxima	Ceftazidima
A	20	19
B	28	24
C	24	9
D	8	10
E	28	28

6. ¿Cuál de los siguientes grupos de diámetros de halo (mm) de las pruebas de tres aislamientos de *E. coli* confirma la producción de una BLEE? Seleccione todas las opciones que apliquen.

Aislamientos <i>E. coli</i>	Ceftazidima – AC*	Ceftazidima	Cefotaxima – AC	Cefotaxima
A	24	24	27	26
B	28	8	23	18
C	18	6	14	8

* AC, ácido clavulánico

7. ¿Cuál de los siguientes grupos de resultados de CIM ($\mu\text{g/mL}$) de las pruebas de tres aislamientos de *K. pneumoniae* confirma la producción de una BLEE?

Aislamientos <i>K. pneumoniae</i>	Ceftazidima – AC*	Ceftazidima	Cefotaxima – AC	Cefotaxima
A	32	8	16	1
B	8	8	1	1
C	16	1	1	1

* AC, ácido clavulánico

8. ¿Deben los laboratorios clínicos realizar la prueba de difusión por disco para beta-lactamasas inducibles?

***Enterobacteriaceae* que producen beta-lactamasas inducibles**

Citrobacter freundii

Enterobacter spp.

Morganella morganii

Providencia spp.

S. marcescens

H. alvei

9. Se aisló una *Shigella* spp. en las heces de un hombre de 28 años de edad. ¿Cuáles agentes antimicrobianos reportaría? Seleccione todas las opciones que apliquen.

- | | |
|-------------------|---------------------------------|
| A. Ampicilina | E. Gentamicina |
| B. Cefazolina | F. Imipenem |
| C. Cefotaxima | G. Piperacilina |
| D. Ciprofloxacina | H. Trimetoprima-sulfamethoxazol |

13

No *Enterobacteriaceae*

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Discutir una estrategia práctica para realizar y reportar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* y otras no *Enterobacteriaceae*.
- Describir los principales puntos de interés sobre la resistencia de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y *S. maltophilia*.
- Enumerar las condiciones de prueba recomendadas para difusión por disco para *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia* y *Burkholderia cepacia*.
- Enumerar las condiciones de prueba recomendadas para microdilución en caldo de CIM para *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y *S. maltophilia*.
- Discutir las limitaciones de las pruebas de difusión por disco para algunas bacterias no *Enterobacteriaceae* y explicar porque se requieren las pruebas de CIM.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

ANTECEDENTES

P. aeruginosa es un patógeno oportunista y causa frecuente de infecciones asociadas a problemas de salud. También es una de las principales causas de infecciones en pacientes con fibrosis quística. Tiende a residir en lugares donde se acumula humedad, incluyendo las tuberías de los ventiladores. El organismo tiene un olor característico a uva y contiene el pigmento piocianina que le da una coloración azul-verdosa en el medio de cultivo.

P. aeruginosa es intrínsecamente resistente a penicilinas de espectro restringido, cefalosporinas de primera y segunda generación, trimetoprim y sulfonamidas. Los agentes en contra de las pseudomonas incluyen penicilinas de espectro extendido, como ticarcilina y piperacilina; cefalosporinas de espectro extendido, como cef-tazidima y cefepima, carbapenemes, aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Sin embargo, los aislamientos de *P. aeruginosa* que son resistentes a uno o más de estos agentes se están volviendo más comunes.

CASO DE ESTUDIO A

Una niña de 8 años de edad con fibrosis quística fue admitida en el hospital con dificultad respiratoria y temperatura de 38,9°C. Dos tipos distintos de colonias de *P.*

aeruginosa se aislaron del cultivo de esputo; una de ellas fue muy mucosa. ¿Cómo procedería con las pruebas de susceptibilidad de estos aislamientos?

Resistencia a Beta-lactámicos

La resistencia de *P. aeruginosa* a los beta-lactámicos se debe a una combinación de:

- Beta-lactamasas
- Bombas de eflujo
- Cambios en las proteínas de la membrana externa (barreras de permeabilidad)
- Cambios en las proteínas de unión a la penicilina

Las penicilinas antipseudomónicas incluyen:

- Carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarcilina
- Ureidopenicilinas: mezlocilina, piperacilina

Las ureidopenicilinas son más activas que las carboxipenicilinas. La piperacilina-tazobactam no ofrece ninguna ventaja significativa sobre la piperacilina contra *P. aeruginosa* porque el inhibidor de beta-lactamasa, tazobactam, no inhibe a la mayoría de beta-lactamasas producidas por *P. aeruginosa*.

La resistencia a cefotaxima, ceftriaxona y otras cefalosporinas de espectro extendido usualmente se debe a la beta-lactamasa del tipo 1 (AmpC), que es mediada cromosómicamente. Cepas de tipo salvaje de *P. aeruginosa* pueden producir AmpC a niveles tan altos que las CIMs *in vivo* se acercan a los límites terapéuticos para estos antibióticos. Por tanto, el uso de estos antibióticos no es recomendado para el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*, particularmente cuando hay otras alternativas que tienen mejor actividad, tales como la ceftazidima. La *cefepima* retiene alguna actividad contra organismos que producen estas beta-lactamasas a menos que haya hiperproducción de enzimas.

En los Estados Unidos la actividad de cefepima es comparable a la de ceftazidima para *P. aeruginosa*. Este podría no ser el caso en su país. El aztreonam es ligeramente menos activo que la ceftazidima contra *P. aeruginosa*.

Los carbapenemes usualmente no son inactivados por las beta-lactamasas (AmpC) producidas por la *P. aeruginosa*, pero puede ocurrir una desactivación con enzimas únicas que hidrolizan el carbapenem. La resistencia también puede deberse a bombas de eflujo. De todos los beta-lactámicos, los carbapenemes tienen el espectro más amplio de actividad contra *P. aeruginosa*.

Resistencia a Aminoglucósidos

P. aeruginosa puede volverse resistente a gentamicina, tobramicina y amikacina de varias maneras:

- La resistencia a bajos niveles de aminoglucósidos se debe a la falta de permeabilidad de la membrana externa.
- La resistencia a altos niveles de aminoglucósidos se debe a enzimas modificadoras de aminoglucósidos.
- Algunos aislamientos son resistentes debido a impermeabilidad y presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos.

La resistencia solo a amikacina (pero no a gentamicina o tobramicina) es altamente inusual.

Resistencia a Fluoroquinolonas

La ciprofloxacina se mantiene como la fluoroquinolona más activa contra *P. aeruginosa*. La resistencia a las fluoroquinolonas se debe a impermeabilidad, bombas de eflujo o mutaciones que afectan las enzimas ADN girasa y topoisomerasa.

Sugerencia técnica: Las fluoroquinolonas están contraindicadas en niños y por lo tanto la mayoría de laboratorios no las reportan rutinariamente en pacientes menores de 12 años de edad.

Estrategia de Prueba

La Tabla 1 del documento M100 del NCCLS sugiere agentes para pruebas de rutina y modos de reportes para *P. aeruginosa*. En la sección sobre difusión por disco, la lista contenida en el Tabla 1 sólo se aplica a *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. Tome en cuenta que el documento M100-S14 (2004) incluye criterios de interpretación para difusión por disco para minociclina, levofloxacina y sulfametoxazol-trimetoprim contra *S. maltophilia* y ceftazidima, meropenem y minociclina para *B. cepacia*.

En las tablas de CIM, la lista de la Tabla 1 incluye *P. aeruginosa* y otras no *Enterobacteriaceae*. Estas no *Enterobacteriaceae* están definidas en una nota de pie de página incluyendo *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia*, *Pseudomonas* spp. y otras bacterias no fastidiosas, y bacilos gram-negativos no fermentadores de glucosa.

A la fecha las únicas no *Enterobacteriaceae* que pueden ser analizadas confiablemente mediante difusión por disco son *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.

Métodos

El NCCLS tiene estándares específicos de pruebas de difusión por disco y CIM para *P. aeruginosa*. Se usan procedimientos estándar de preparación del inóculo, inoculación e incubación. La Tabla 1 del NCCLS enumera los antimicrobianos sugeridos para pruebas y reportes.

El NCCLS aborda las pruebas de *P. aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística con este comentario:

“La susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de pacientes con fibrosis quística puede ser determinada confiablemente mediante el método de difusión por disco, dilución en agar de referencia o métodos de referencia de microdilución en caldo congelado, pero podría requerir extender la incubación hasta 24 horas.”

Métodos: Interpretación de Resultados

La Tabla 2B del documento M100 del NCCLS, tanto en las secciones de difusión por disco como de CIM contiene criterios de interpretación para no *Enterobacteriaceae*, incluyendo *P. aeruginosa*.

Algunos agentes enumerados, tales como ampicilina-sulbactam, son inapropiados para *P. aeruginosa* pero están listados para otras especies del grupo no *Enterobacteriaceae*.

Varios beta-lactámicos, como la piperacilina-tazobactam, tienen criterios de interpretación separados para *P. aeruginosa* y otras no *Enterobacteriaceae*.

Métodos: Reporte de Resultados

La Tabla 2B del documento M100 del NCCLS contiene un comentario “Rx” para enfatizar la necesidad de usar terapia combinada en el tratamiento de infecciones serias de *P. aeruginosa*. Recuerde que debe considerar añadir este comentario o una variación del mismo en el reporte de laboratorio. La decisión para hacer esto debe basarse en las políticas de su institución.

Control de Calidad

Revise el Capítulo 6 AC/CC de este manual para obtener instrucciones específicas sobre pruebas de CC para *P. aeruginosa*.

Las cepas de CC recomendadas por el NCCLS son:

- *P. aeruginosa* ATCC 27853
- *E. coli* ATCC 25922
- *E. coli* ATCC 35218 (para combinaciones de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactámicos)

ACINETOBACTER SPP. ANTECEDENTES

Los *Acinetobacter* spp. son patógenos oportunistas frecuentemente asociados con brotes de infecciones intrahospitalarias, particularmente entre pacientes con compromiso inmune.

La diferenciación entre los 21 grupos de homología de ADN (conocidos como especies de genoma) de *Acinetobacter* spp. es difícil. Sin embargo, los miembros del complejo *A. baumannii* son los aislamientos típicamente más comunes obtenidos en brotes hospitalarios y tienden a ser más resistentes a los agentes antimicrobianos que otros *Acinetobacter* spp.

CASO DE ESTUDIO B

Una mujer de 34 años de edad sufrió un severo trauma craneo encefálico después de resbalar de un risco mientras caminaba en la montaña. Luego de una extensa cirugía de cabeza y cuello, fue colocada en un ventilador en la unidad neuroquirúrgica de terapia intensiva. Cinco días después ella presentó fiebre y desarrolló un infiltrado pulmonar. Los cultivos de sangre y secreciones respiratorias resultaron en el mismo organismo, el que fue identificado como *Acinetobacter baumannii* resistente a ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, piperacilina, tobramicina y sulfametoxazol-trimethoprim.

¿Deberían realizarse más pruebas en este aislamiento para verificar los resultados obtenidos? ¿Deberían probarse más agentes antimicrobianos?

Luego de completar este capítulo usted será capaz de responder estas preguntas.

Resistencia a Beta- lactámicos

La resistencia a los beta- lactámicos por parte de *Acinetobacter* spp. puede deberse a las beta-lactamasas (carbapenemasas), alteraciones en las proteínas de unión a penicilina, a la expresión sistemas de bomba de eflujo de múltiples antimicrobianos o la alteración de la permeabilidad de la membrana externa provocada por la pérdida de porinas. La resistencia a imipenem/meropenem puede ocurrir en cepas nosocomiales que poseen una combinación de varios mecanismos en el mismo organismo.

Resistencia a Aminoglucósidos

Los *Acinetobacter* spp. poseen una amplia variedad de enzimas modificadoras de aminoglucósidos y los perfiles de susceptibilidad pueden variar considerablemente entre los aislamientos clínicos. Las cepas pueden ser resistentes a amikacina, gentamicina y tobramicina.

Resistencia a Fluoroquinolonas

A pesar que las fluoroquinolonas demuestran actividad contra muchos aislamientos de *Acinetobacter* spp., la resistencia se está volviendo mas común. La resistencia a las fluoroquinolonas se debe a bombas de eflujo y mutaciones que afectan las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV.

Resistencia a Otros Agentes

Los *Acinetobacter* spp. pueden desarrollar resistencia a una amplia variedad de agentes antimicrobianos durante periodos de tiempo relativamente cortos. Cepas multiresistentes sensibles solo a polimixina B o colistina se han identificado en todo el mundo. No existen criterios de interpretación del NCCLS para el tamaño de los halos o CIMs de polimixina B o colistina. La resistencia múltiple de *Acinetobacter* spp. es una consecuencia de la presencia de múltiples bombas de eflujo, porinas alteradas que reducen la absorción a los agentes antimicrobianos, proteínas de unión a la penicilina alteradas y producción de gran amplitud de enzimas beta- lactamasas y modificadoras de aminoglucósidos.

Estrategia de Prueba

La Tabla 1 del documento M100 del NCCLS sugiere los antimicrobianos para pruebas de rutina y reportes contra *Acinetobacter* spp. En la sección sobre difusión por disco, la lista contenida en el Tabla 1 es aplicable sólo para *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp..

En los cuadros de CIM, la lista de la Tabla 1 incluye *P. aeruginosa* y otras no *Enterobacteriaceae*. Estas no *Enterobacteriaceae* están definidas en una nota de pie de página incluyendo *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia*, *Pseudomonas* spp. y otras bacterias no fastidiosas, bacilos gram-negativos no fermentadores de glucosa.

Métodos

El NCCLS tiene estándares específicos de pruebas de difusión por disco y CIM para *Acinetobacter* spp. Sin embargo, los resultados de estas dos pruebas no siempre pueden coincidir, particularmente para antimicrobianos beta-lactámicos como la piperacilina. Cuando se usan procedimientos estándar de preparación del inóculo, inoculación e incubación, los resultados para carbapenemes, fluoroquinolonas y amikacina obtenidos con ambos métodos son consistentes. La Tabla 1 del NCCLS enumera los medicamentos sugeridos para pruebas y reportes.

Métodos: Interpretación y Reporte de Resultados

El Cuadro 2B del NCCLS tanto en las secciones de difusión por disco como de CIM contiene criterios de interpretación para no *Enterobacteriaceae*, incluyendo *P. aeruginosa*.

En la Tabla 2B de difusión por disco, varios beta-lactámicos, tales como piperacilina, tienen criterios de interpretación separados para *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. Algunos agentes enumerados, tales como ampicilina-sulbactam, tienen recomendaciones específicas para *Acinetobacter* spp.

Los criterios de interpretación para no *Enterobacteriaceae* del Cuadro 2B de CIM se aplican a *Acinetobacter* spp.

Control de Calidad

Las cepas de CC recomendadas por el NCCLS para *P. aeruginosa* son:

- *P. aeruginosa* ATCC 27853
- *E. coli* ATCC 25922
- *E. coli* ATCC 35218 (para combinaciones de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas)

Comentario sobre el Caso de Estudio B

Como se señaló anteriormente, del cultivo de sangre y esputo de la mujer en UTI de neurocirugía se obtuvo un aislamiento de *A. baumannii* muy resistente a todos los agentes antimicrobianos reportados rutinariamente. Si la prevalencia de cepas con resistencia múltiple en su población de pacientes es baja, se deben considerar varias cuestiones para determinar qué hacer con el aislamiento. A pesar del perfil de resistencia de *A. baumannii* descrito anteriormente, usted debe considerar la verificación de estos resultados por:

- Confirmación de la identificación
- Confirmación de la susceptibilidad

Si hay una sospecha de que los métodos utilizados podrían haber conducido a resultados erróneos, se debe usar un método alternativo para confirmar los resultados.

Sugerencia Técnica: Asegúrese de que las muestras no se contaminaron. El análisis de poblaciones mixtas de bacterias puede conducir a lo que podrían parecer bacterias altamente resistentes.

STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA

ANTECEDENTES

La *S. maltophilia*, conocida anteriormente como *Pseudomonas maltophilia* y *Xanthomonas maltophilia*, es un patógeno oportunista que es cada vez más prevalente en infecciones nosocomiales, principalmente entre pacientes inmunodeprimidos. A pesar que la *S. maltophilia* puede causar muchos tipos diferentes de infecciones, por lo general las vías respiratorias son la fuente de la mayoría de los aislamientos clínicos de *S. maltophilia*.

S. maltophilia es intrínsecamente resistente a muchos agentes antimicrobianos de amplio espectro. El agente de elección para las infecciones por *S. maltophilia* es sulfametoxazol-trimetoprima, que puede ser prescrito en combinación con ticarcilina-ácido clavulánico o rifampicina. En ocasiones, otros agentes considerados para terapia incluyen cloranfenicol o minociclina.

CASO DE ESTUDIO C

Una mujer de 19 años de edad con carcinoma del hígado desarrolló fiebre, dolor abdominal y vómito. Ella fue admitida en el centro médico local donde se le tomaron muestras para hemocultivo. Se le inició terapia con cefuroxima y gentamicina.

Al día siguiente se aisló *S. maltophilia* y la paciente se mantuvo febril. La paciente era alérgica a las sulfas así que la terapia con sulfametoxazol-trimethoprim no

fue posible. El médico pidió al laboratorio resultados adicionales de susceptibilidad. ¿Qué agentes deben probarse?

Resistencia a Beta- lactámicos

La resistencia de *S. maltophilia* a los beta- lactámicos con frecuencia se debe a dos distintas beta- lactamasas designadas como L1 y L2,

- L1 es una metaloenzima (contiene Zn⁺⁺ en el sitio activo de la enzima) que se encuentra virtualmente en todas las *S. maltophilia*. L1 confiere resistencia a imipenem y meropenem.
- L2 es una cefalosporinasa y es inhibida por inhibidores de beta- lactamasa como el ácido clavulánico.

Otras beta- lactamasas han sido identificadas en *S. maltophilia*, y algunas veces la resistencia a los beta- lactámicos podría también deberse a cambios en las porinas. *In vitro*, se pueden aislar con alta frecuencia mutantes resistentes a meropenem; por lo tanto se debe evitar el uso de este antibiótico en pacientes.

Resistencia a Aminoglucósidos

La resistencia de *S. maltophilia* a los aminoglucósidos se cree que es debida a la falta de permeabilidad en la membrana externa a estos antimicrobianos. La resistencia debida a enzimas modificadoras de aminoglucósidos es poco común en esta especie. *S. maltophilia* es típicamente resistente a todos los aminoglucósidos.

Resistencia a Fluoroquinolonas

A pesar que *S. maltophilia* podría aparecer susceptible a las fluoroquinolonas, la resistencia puede desarrollarse rápidamente, como resultado de mutaciones en los genes que poseen el código de las proteínas de la membrana externa. Consecuentemente, las fluoroquinolonas no se usan como agentes únicos en el tratamiento de infecciones causadas por *S. maltophilia*.

Resistencia a Otros Agentes

La resistencia al sulfametoxazol-trimetoprima ocurre en aproximadamente el 2-5% de los aislamientos de *S. maltophilia*. Las cepas de *S. maltophilia* son frecuentemente resistentes a minociclina y cloranfenicol, probablemente debido a la presencia de bombas de eflujo o cambios en las proteínas de la membrana externa.

Estrategia de Prueba

S. maltophilia fue recientemente agregada a la Tabla 1 de difusión por disco en el documento M100 del NCCLS.

La Tabla 1 del documento M100 del NCCLS M100 enumera antimicrobianos para pruebas y reportes de no *Enterobacteriaceae*. Varios de éstos están enumerados específicamente para no *Enterobacteriaceae* diferentes de *P. aeruginosa*, los que incluyen: cloranfenicol, tetraciclina, ticarcilina-ácido clavulánico y sulfame-

toxazol-trimetoprima. Además, la Tabla 2B que contiene los criterios de interpretación de CIM que lista al moxalactam como una opción para *S. maltophilia*. Sin embargo, este agente no está disponible para uso de rutina en los Estados Unidos.

Métodos

Los métodos de CIM del NCCLS han sido estandarizados para pruebas de *S. maltophilia*. Las pruebas de difusión por disco han sido estandarizadas solo para los siguientes agentes antimicrobianos: minociclina, levofloxacina y sulfametoxazol-trimethoprim. Se usan procedimientos estandarizados de preparación del inóculo, inoculación e incubación para las pruebas de difusión por disco y CIM.

Existen inquietudes permanentes sobre la baja correlación entre resultados *in vitro* con la respuesta *in vivo* en los casos asociados a *S. maltophilia*. La capacidad de realizar estudios prospectivos y proporcionar lineamientos adicionales está limitada por:

- Dificultad en identificar una metodología de prueba aceptable.
- Dificultad para distinguir una infección de una colonización en los pacientes.
- La necesidad de tratar las infecciones de *S. maltophilia* con terapia combinada.

Métodos: Interpretación y Reporte de Resultados

La Tabla 2B del NCCLS en la sección de difusión por disco contiene criterios de interpretación para *S. maltophilia* solo en relación a minociclina, levofloxacina y sulfametoxazol-trimethoprim. El método de difusión por disco no debe utilizarse para pruebas con otros agentes antimicrobianos.

La Tabla 2B, en la sección de CIM, contiene criterios de interpretación para no *Enterobacteriaceae* incluyendo *S. maltophilia*. Varios beta-lactámicos tienen criterios de interpretación separados para *P. aeruginosa* y otras no *Enterobacteriaceae*. Los criterios de interpretación para “otras no *Enterobacteriaceae*” se aplican a *S. maltophilia*. (Ver ticarcilina-ácido clavulánico que presenta dos grupos de criterios de interpretación y un comentario para *S. maltophilia*.)

Control de Calidad

Las cepas de CC recomendadas por el NCCLS para *P. aeruginosa* son:

- *P. aeruginosa* ATCC 27853
- *E. coli* ATCC 25922
- *E. coli* ATCC 35218 (para combinaciones de beta-lactámicos/inhibidores de beta-lactamasas)

OTRAS NO ENTEROBACTERIACEAE

Las no *Enterobacteriaceae* diferentes de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia* y *B. cepacia* se deben analizar solo con métodos de CIM porque no hay métodos estandarizados de difusión por disco para realizar pruebas en estas bacterias.

Las recomendaciones para éstas pruebas son las mismas que aquellas descritas para *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia* y *B. cepacia*. No hay comentarios únicos para otras no *Enterobacteriaceae*.

REVISIÓN

Ahora usted debe tener conocimiento acerca de las recomendaciones para las pruebas de rutina de susceptibilidad antimicrobiana para *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia*, *B. cepacia* y otras no *Enterobacteriaceae*.

Recuerde:

- Usar los estándares más actualizados del NCCLS (M2 y M7) para las pruebas de no *Enterobacteriaceae*.
- Usar métodos de CIM para miembros de las no *Enterobacteriaceae* diferentes de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia* o *B. cepacia*.
- Leer minuciosamente las instrucciones adjuntas de cualquier producto comercial antes de utilizarlo para pruebas de no *Enterobacteriaceae*. Algunos sistemas comerciales no son satisfactorios para el análisis de estos organismos.

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

1. De la siguiente lista, seleccione cinco beta-lactámicos que por lo general son activos contra *P. aeruginosa*.
 - A. Ampicilina
 - B. Ampicilina-sulbactam
 - C. Cefazolina
 - D. Cefepima
 - E. Ceftazidima
 - F. Imipenem
 - G. Piperacilina
 - H. Ticarcilina
2. Una prueba de CIM con ceftazidima por el método de microdilución en caldo para un aislamiento de *P. aeruginosa* ha producido un buen crecimiento en los pozos con concentraciones <1.0 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, hay un ligero crecimiento en los pozos con concentraciones entre 2,0 y 32 $\mu\text{g/mL}$, la cual se observa como una ligera “opacidad”. Una repetición de la prueba cuidadosamente estandarizada no produjo ningún crecimiento a $>2,0$ $\mu\text{g/mL}$. ¿Podría el resultado inicial haberse debido a un problema de inoculación?
 - A. Sí
 - B. No
3. Usted ha realizado una prueba de difusión por disco en una cepa mucosa de *P. aeruginosa* aislada del esputo de un paciente anciano. En la prueba inicial y en la repetición, el crecimiento fue ligero e insuficiente para interpretar los resultados. ¿Qué haría usted?
 - A. Contactar al médico y explicarle que este aislamiento crece pobremente utilizando el procedimiento rutinario de prueba. Determinar si es necesario obtener resultados de CIM para la atención al paciente.
 - B. Medir los halos, interpretar y reportar resultados.
 - C. Repetir la prueba de difusión por disco por tercera vez.
4. Usted obtuvo una CIM de piperacilina de 64 $\mu\text{g/mL}$ en un aislamiento de *P. aeruginosa*. Los criterios de interpretación para piperacilina se encuentran en el Cuadro 2B. ¿Cómo interpretaría el resultado?

- A. Susceptible
B. Intermedia
C. Resistente
5. ¿Cómo procedería con las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de las colonias mucosas y no mucosas aisladas de un cultivo del mismo espécimen?
- A. Combinar las cepas de las colonias mucosas y no mucosas y realizar una sola prueba de susceptibilidad.
B. Analizar solamente la colonia de tipo mucoso.
C. Realizar pruebas separadas en las cepas mucosas y no mucosas.
D. Abstenerse de realizar cualquier prueba de susceptibilidad.
6. Suponiendo que los siguientes métodos están su disposición, ¿Cuál de ellos podría usted usar para obtener resultados confiables en los aislamientos de la pregunta 5? Seleccione todas las opciones que apliquen.
- A. Solo difusión por disco
B. Solo microdilución en caldo
C. Difusión por disco o microdilución en caldo de CIM
D. Un método comercial automatizado de CIM
7. A continuación está el reporte final para los dos tipos de colonias de la Pregunta 5.

Fuente del Especimen: Espudo

Resultados: Denso crecimiento mucoso de *Pseudomonas aeruginosa* (1)

Denso crecimiento no mucoso de *Pseudomonas aeruginosa* (2) Microbiota Respiratoria normal.

	(1)	(2)
Ceftazidima	S	R
Gentamicina	S	R
Imipenem	–	S
Piperacilina	S	R
Tobramicina	–	S

Comentario: Los pacientes con infecciones serias de *P. aeruginosa* podrían requerir dosis máximas de un beta- lactámico en combinación con un aminoglucósido.

¿Por qué se reportaron tres antimicrobianos para el aislamiento mucoso y cinco para el aislamiento no mucoso?

- A. El imipenem nunca debe ser reportado en *P. aeruginosa* mucosa.
B. La cepa mucosa es susceptible a los agentes de primera elección y de acuerdo con la política de reporte selectivo del laboratorio, los antimicrobianos de segunda elección no son reportados.
C. La tobramicina nunca debe ser reportada en una *P. aeruginosa* susceptible a gentamicina.
8. Revise los organismos listados a continuación. Seleccione el perfil de susceptibilidad que mejor se complementa a cada microorganismo.
- A. Una cepa nosocomial de *A. baumannii*
B. Una cepa adquirida en la comunidad de *A. baumannii* asociada con colonización del paciente
C. *A. lwoffii*

	(1)	(2)	(3)
Cefotaxima	R	S	S
Gentamicina	R	S	S
Imipenem	R	S	S
Piperacilina	R	S	R
Tobramicina	R	S	S
Sulfametoxazol-trimetoprim	R	S	S

9. ¿Cuál(es) agente(s) antimicrobiano(s) adicional(es) se debería(n) probar contra el aislamiento (1) de la Pregunta 8? Seleccione todas las opciones que apliquen.

- A. Ampicilina-sulbactam
- B. Polimixina B
- C. Vancomicina

10. Reporte de Laboratorio

Fuente del Espécimen: Esputo obtenido por expectoración

Resultados: Pocas UFC de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Microbiota respiratoria normal.

¿Realizaría usted pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en este aislamiento?

- A. Sí
- B. No

11. Reporte de Laboratorio

Fuente del Espécimen: aspirado traqueal

Resultados: *Stenotrophomonas maltophilia*

Comentarios: Las pruebas de susceptibilidad de *S. maltophilia* no se realizan rutinariamente.

Sulfametoxazol-trimetoprim es el medicamento de elección para tratar infecciones causadas por *S. maltophilia*.

¿Por qué es este tipo de reporte razonable? Seleccione todas las opciones que apliquen.

- A. *S. maltophilia* es difícil de analizar y la correlación entre resultados *in vitro* e *in vivo* es limitada.
- B. *S. maltophilia* no crece bien en sistemas de prueba de rutina de CIM.
- C. Sulfametoxazol-trimetoprim es el medicamento de elección para *S. maltophilia* y existe poca resistencia a este agente.

12. Un médico pidió los resultados de imipenem puesto que no fue incluido en el reporte de laboratorio presentado en la Pregunta 11. El imipenem es probado rutinariamente en bacterias gram-negativas en su laboratorio. ¿Cómo debería usted responder?

- A. Revisar los resultados de imipenem y entregarlos al médico.
- B. Informar al médico que el imipenem no es activo contra *S. maltophilia* y esta es la razón por la cual el laboratorio no lo reportó.

13. ¿Qué agentes antimicrobianos reportaría usted en un aislamiento de *S. maltophilia* en sangre? Seleccione todas las opciones que apliquen

- A. Ticarcilina
- B. Ticarcilina-ácido clavulánico
- C. Sulfametoxazol-trimetoprim
- D. Cloranfenicol
- E. Tetraciclina

14. Si se sabe que este paciente es alérgico a las sulfas ¿Qué agentes antimicrobianos adicionales podrían ser reportados? Seleccione todas las opciones que apliquen.

- A. Ceftazidima
- B. Ciprofloxacina
- C. Meropenem

Los agentes antimicrobianos reportados podrían variar dependiendo de las políticas de su laboratorio y deben reflejar los agentes que podrían ser considerados para la terapia combinada contra *S. maltophilia*.

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Discutir una estrategia práctica para realizar pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de *Haemophilus* spp. en su laboratorio.
- Describir donde encontrar recomendaciones para las condiciones de prueba, incluyendo preparación del inóculo, medio de prueba, duración y atmósfera de incubación para pruebas de difusión por disco y de CIM de *Haemophilus* spp.
- Describir los métodos que pueden ser usados para detectar *H. influenzae* productores de beta-lactamasa y cepas beta-lactamasa negativas resistentes a la ampicilina (BLNRA).
- Explicar el fundamento para utilizar dos cepas de control de calidad cuando se realizan pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos con *Haemophilus* spp.

HAEMOPHILUS INFLUENZAE VS. OTROS HAEMOPHILUS SPP.

Los métodos descritos en este capítulo están estandarizados para *Haemophilus influenzae* y otros *Haemophilus* spp. Debido a que otros *Haemophilus* spp. diferentes de *H. influenzae* son analizados con poca frecuencia en la rutina del laboratorio clínico, el énfasis de este capítulo será en pruebas y reportes de susceptibilidad a los antimicrobianos de *H. influenzae*.

ANTECEDENTES

Antes que la vacuna para *H. influenzae* tipo b estuviese disponible, *H. influenzae* era una de las principales causas de meningitis en niños/as en los Estados Unidos. La meningitis y otras enfermedades sistémicas debidas a este serotipo son ahora poco comunes en los Estados Unidos.

NIÑOS/AS VS. ADULTOS

H. influenzae, particularmente las cepas no tipificables, continúan causando otitis media e infecciones de las vías respiratorias en niños/as. En adultos, *H. influenzae* también está asociado con infecciones de las vías respiratorias. *H. influenzae* podría también causar bacteriemia en pacientes con SIDA.

Los agentes antimicrobianos comúnmente utilizados para tratar infecciones causadas por *H. influenzae* incluyen amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas, macrólidos y tetraciclinas. Además, para niños/as, a veces se prescribe trimetoprima-sulfamethoxazole. Para adultos, se podría usar una fluoroquinolona.

ESTUDIO DE CASO

Un paciente de 28 años de edad con SIDA fue admitido al hospital por presentar tos productiva, letargia extrema y fiebre de 39,5°C. Se tomó dos muestras de sangre para cultivo y se le inició terapia con ceftriaxone y gentamicina. Al siguiente día, *H. influenzae* fue aislado de ambos cultivos de sangre. El médico notó que el informe final del laboratorio (verlo más abajo) indicó que el organismo era beta-lactamasa positivo. No se reportó resultados adicionales de pruebas de susceptibilidad.

Reporte de Laboratorio

Fuente del espécimen: sangre

Resultados: *Haemophilus influenzae*

Comentario: beta-lactamasa positivo; resistente a amoxicilina y ampicilina.

Dado los resultados de beta-lactamasa, el médico estaba preocupado porque el aislamiento podría no ser susceptible a ceftriaxone.

¿Provee la prueba de beta-lactamasa suficiente información para el tratamiento de este paciente? ¿Cómo le respondería usted al médico?

Luego de completar este capítulo el lector/lectora estará en capacidad de responder estas preguntas y comentar sobre la estrategia de pruebas de laboratorio para aislamientos de sangre de *H. influenzae*.

Resistencia – Amoxicilina y Ampicilina

- En los Estados Unidos, aproximadamente 40% de los aislamientos de *H. influenzae* producen una beta-lactamasa mediada por un plásmido que confiere resistencia a amoxicilina y ampicilina. Las beta-lactamasas TEM-1 y ROB-1 se encuentran en *H. influenzae*.
- Debido a que la amoxicilina es usada frecuentemente para el tratamiento de infecciones de vías respiratorias, la prueba de *H. influenzae* para detectar producción de beta-lactamasa es útil, puesto que la amoxicilina es hidrolizada o inactivada por la beta-lactamasa.
- Ocasionalmente hay cepas de *H. influenzae* que no producen beta-lactamasa pero no obstante son resistentes a amoxicilina y ampicilina debido a los cambios en las proteínas de unión a penicilina (PBPs). Estas cepas son designadas como “beta-lactamasa negativas, resistentes a ampicilina” o cepas BLNRA.

Resistencia - Otros Agentes

- La resistencia a cefalosporinas y nuevos macrólidos, los que se usan comúnmente para tratar infecciones de vías respiratorias, es poco frecuente en *H. influenzae*.

- La resistencia a cefalosporinas de espectro extendido ha sido reportada en raras ocasiones pero no ha sido confirmada.
- La resistencia a las fluoroquinolonas es también rara.
- Aproximadamente 10-20% de los aislamientos de *H. influenzae* son resistentes a trimetoprima-sulfamethoxazole.

Estrategia de Prueba

El Cuadro 1 del documento M100 del NCCLS provee sugerencias útiles para desarrollar una estrategia de prueba para *H. influenzae*.

Group A Primary Test and Report

Haemophilus spp.

Ampicillin

Trimethoprim-sulfamethoxazole

El **Grupo A** de este cuadro contiene dos agentes, ampicilina y trimetoprim-sulfamethoxazole.

A pesar que las pruebas de beta-lactamasa identificarán a la mayoría de cepas resistentes a ampicilina, de todas maneras es importante probar la ampicilina con un método de CIM o de difusión por disco en infecciones serias causadas por cepas beta-lactamasa-negativas.

La pruebas de trimetoprim-sulfamethoxazole podrían ser necesarias dependiendo de las políticas de uso e incidencia de resistencia en un área geográfica en particular.

Los agentes del **Grupo B** son usados principalmente para tratar infecciones serias, como meningitis, bacteriemia y epiglotitis. Estos agentes son administrados parenteralmente. Los resultados de las pruebas de una de las cefalosporinas de tercera generación y meropenem deben ser reportados en aislamientos de líquido cefalorraquídeo (LCR).

Group B Primary Test Report Selectively

Cefotaxime or ceftazidime or ceftizoxime or
ceftriaxone

Cefuroxime sodium (parenteral)

Chloramphenicol

Meropenem

El Grupo C incluye muchos agentes que se administran por vía oral. Sin embargo, estos agentes son raramente probados en el laboratorio. A continuación consta una nota de pie de página sobre el Grupo C del Cuadro 1A.

“[Estos agentes] podrían ser usados como terapia empírica para infecciones de vías respiratorias por *Haemophilus* spp. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad con estos agentes por lo general no son útiles para el manejo de pacientes individuales. Sin embargo, las pruebas de susceptibilidad de *Haemophilus* spp. a estos compuestos podrían ser apropiadas para vigilancia o estudios epidemiológicos.”

**Group C Supplemental
Report Selectively**

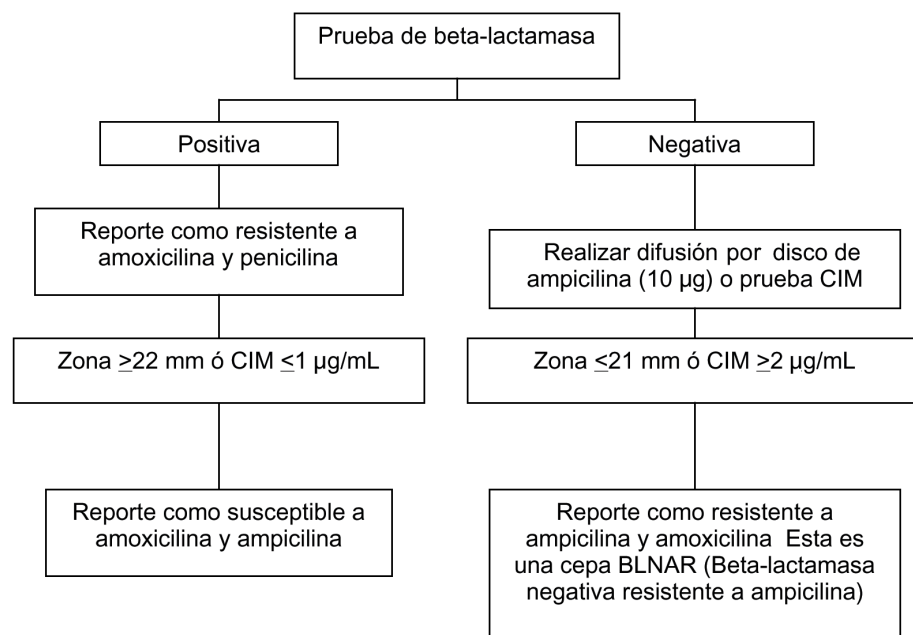
Azithromycin or clarithromycin
 Aztreonam
 Cefaclor or cefprozil or Loracarbef
 Cefdinir or cefixime or cefpodoxime
 Cefonicid
 Cefuroxime azetil (oral)
 Ciprofloxacin or gatifloxacin or leveofloxacin or lomefloxacin
 or moxifloxacin or ofloxacin or aparfloxacin
 Gemifloxacin
 Ertapemen or imipenem
 Rifampin
 Tetracycline

Métodos—Prueba de Beta-lactamasa

La mayoría de las pruebas rápidas estándares de búsqueda de beta-lactamasa son satisfactorias para *H. influenzae*. El algoritmo (que se presenta a continuación) muestra como la prueba de beta-lactamasa es usada para deducir resultados para ampicilina y amoxicilina.

Consulte el Capítulo 2 Beta-Lactamasas de este manual para obtener instrucciones para realizar pruebas de beta-lactamasa.

Prueba de Beta-lactamasa para Resistencia a Amoxicilina y Ampicilina



Métodos—Condiciones de Incubación

El NCCLS tiene estándares específicos de pruebas para *Haemophilus* spp.

Métodos de rutina de difusión de disco y CIM se hacen con estas modificaciones

Método	Medio	Incubación	
		Tiempo (h)	Atmósfera
Difusión disco	Agar HTM*	16–18	CO ₂ (5%)
Caldo CIM	Caldo HTM*	20–24	Aire ambiente

* HTM. Medio de prueba para *Haemophilus*

Consulte los capítulos sobre pruebas de difusión por disco y de CIM para obtener instrucciones sobre el procedimiento.

Métodos—Notas para la Preparación del Inóculo

Los resultados de pruebas de rutina de difusión por disco y CIM para *Haemophilus* spp. y agentes beta-lactámicos son afectados significativamente por el número de bacterias en el inóculo de la prueba, por lo tanto la estandarización del inóculo es muy importante.

Un inóculo concentrado podría conducir a falsa resistencia, particularmente con agentes beta-lactámicos.

Sugerencia técnica:

- Use el método de estandarización directa para la preparación del inóculo.
- Seleccione colonias de una placa que no tenga más de 24 h (preferiblemente 20–24 h).
- Preferentemente use un dispositivo fotométrico para estandarizar la suspensión del inóculo.

Métodos—Medición de Halos

El agar HTM es translúcido y ligeramente más amarillo que el agar Mueller-Hinton (MHA).



Figura 14.1—Dobles zonas de inhibición con un círculo verde indicando el verdadero diámetro de la zona

Métodos—Interpretación de Resultados

- La Tabla 2E del documento M100 del NCCLS, tanto en la sección de difusión por disco como de CIM, contiene criterios de interpretación para *Haemophilus* spp.
- La Tabla 2E se aplica a *H. influenzae* y otros *Haemophilus* spp., que crecen en forma similar a *H. influenzae*.
- Para varios agentes antimicrobianos, incluyendo cefotaxima y ceftriaxone (ver cuadro siguiente), hay solamente criterios de interpretación de “susceptible”. La resistencia a estos agentes entre los *Haemophilus* spp. no ha sido reportada hasta ahora.

Haemophilus spp. Criterios de Interpretación—Cefotaxima & Ceftriaxone

	Contenido del Disco (mg)	Difusión de Disco (mm)		
		Susceptible	Intermedia	Resistente
Cefotaxima	30	≥ 26	–	–
Ceftriaxone	30	≥ 26	–	–
		CIM (µg/mL)		
		Susceptible	Intermedia	Resistente
Cefotaxima		≤ 2	–	–
Ceftriaxone		≤ 2	–	–

Sugerencia técnica: Si encuentra un *Haemophilus* spp. que no es susceptible a cefotaxima o cualquier otro medicamento para el cual solo hay criterios de interpretación de susceptible:

- Confirme la identificación.
- Confirme resultados de susceptibilidad.
- Envíe el aislamiento a un laboratorio de referencia para una prueba de CIM según el método de referencia de microdilución en caldo del NCCLS.
- Guarde el aislamiento.

Reporte de Resultados—BLNAR

Los aislamientos que son resistentes a ampicilina y amoxicilina por cambios en las proteínas de unión a penicilina frecuentemente aparecen como susceptibles a estos agentes en las pruebas *in vitro*, pero los pacientes no responden clínicamente a estos medicamentos.

Por tanto, los siguientes agentes antimicrobianos deben ser reportados como resistentes sin importar sus resultados en las pruebas *in vitro*, suponiendo que estos son normalmente reportados por el laboratorio:

Amoxicilina ácido clavulánico	Cefonicida
Ampicilina-sulbactam	Cefprozil
Cefaclor	Cefuroxima
Cefamandole	Loracarbef
Cefetamet	Piperacilina-tazobactam

Control de Calidad

Revise el Capítulo 6 AC/CC de este manual para obtener instrucciones específicas sobre pruebas de CC para *Haemophilus* spp.

Dos cepas de control de calidad son recomendadas para pruebas de difusión por disco y de CIM de *Haemophilus* spp.

- El *H. influenzae* ATCC 49247 (ampicilina-R beta-lactamasa negativo) es usado para CC de la mayoría de agentes pero no tiene buen desempeño con carbapenemes y ciertos cefemes. Consecuentemente, es necesaria una segunda cepa de CC cuando estos agentes son probados.
- El *H. influenzae* ATCC 49766 es usado para CC de cefaclor, cefamandole, cefdinir, cefonicida, cefprozil, cefuroxima, imipenem, loracarbef y meropenem.

Tomando como base las sugerencias del NCCLS y para satisfacer las necesidades de los médicos, una estrategia práctica para pruebas de aislamientos de *H. influenzae* asociados con infecciones que ponen en riesgo la vida de los pacientes sería:

- Realizar una prueba de beta-lactamasa.
- Realizar pruebas de difusión por disco o CIM con agente(s) antimicrobianos específicos que el médico esté considerando para la terapia.

REVISIÓN

Ahora el lector/a debería estar familiarizado con los métodos de prueba de susceptibilidad antimicrobiana para *H. influenzae* y otros *Haemophilus* spp.

Recuerde:

- Usar los estándares más actualizados del NCCLS (M2 y M7) para obtener las instrucciones para pruebas de *Haemophilus* spp. Los estándares M100 son actualizados anualmente y contienen tablas recientes, incluyendo sugerencias para los reportes.
- Realizar una prueba de beta-lactamasa como una forma rápida para determinar si el aislamiento es resistente a amoxicilina o ampicilina.
- Considerar pruebas con ampicilina (para cepas beta-lactamasa-negativas), una cefalosporina de tercera generación y cloramfenicol en aislamientos que causen infecciones que amenazen la vida. Pruebe meropenem si forma parte del vademécum de su institución.

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

1. ¿Son los resultados de una prueba de beta-lactamasa suficientes para aislamientos de sangre?
A. Sí
B. No
2. ¿Qué agentes sugiere el NCCLS para pruebas de aislamientos de *H. influenzae* de pacientes con infecciones que amenazan su vida, como meningitis? Seleccione todas las que apliquen.
A. Ampicilina
B. Una cefalosporina de tercera generación

- C. Cloramfenicol
 - D. Meropenem
3. ¿Qué enfoque sugiere el NCCLS para pruebas de aislamientos de *H. influenzae* de otras localizaciones del cuerpo (eje., aislamientos respiratorios)? El Cuadro 1A del documento M100 del NCCLS le ayudará con esto.
- A. Prueba solo para beta-lactamasa.
 - B. Prueba solo para ampicilina y trimetoprima-sulfamethoxazole.
 - C. Prueba solo para ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico y trimetoprima-sulfamethoxazole.
4. ¿Por qué algunos laboratorios realizan solo la prueba de beta-lactamasa en vez de seguir estrictamente las sugerencias del NCCLS cuando analizan *H. influenzae*? Seleccione todas las que apliquen.
- A. La resistencia a ampicilina/amoxicilina es la principal preocupación en los aislamientos de *H. influenzae* de las vías respiratorias y esos resultados son fácilmente predecibles con la beta-lactamasa.
 - B. Las pruebas de difusión por disco y CIM para *H. influenzae* requieren agar HTM o caldo, los cuales son caros.
 - C. BLNRA son poco comunes.
 - D. A la fecha, no ha sido reportada resistencia a cefalosporinas de tercera generación.
5. ¿Por qué algunos *H. influenzae* resistentes a ampicilina no pueden ser detectados por la beta-lactamasa?
- A. La prueba carece de sensibilidad y especificidad para *H. influenzae*.
 - B. Unos pocos aislamientos son resistentes a ampicilina por un mecanismo alternativo de resistencia.
 - C. Algunos aislamientos de *H. influenzae* son pigmentados y no pueden analizarse confiablemente con una prueba colorimétrica.

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Describir los asuntos principales sobre la resistencia en *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* y *Moraxella catarrhalis*.
- Enumerar las condiciones recomendadas para las pruebas de CIM en difusión por disco o dilución en agar de *N. gonorrhoeae*, como por ejemplo la preparación del inóculo, medio en agar, atmósfera y duración de la incubación.
- Discutir las limitaciones de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de *N. meningitidis*.
- Describir una estrategia práctica para analizar y reportar la susceptibilidad a los antimicrobianos de *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *M. catarrhalis*.
- Discutir las ventajas y desventajas de la prueba de beta-lactamasa para *M. catarrhalis*.

**NEISSERIA GONORRHOEAE
ANTECEDENTES**

N. gonorrhoeae continúa siendo una causa común de enfermedades transmitidas sexualmente en todo el mundo. La penicilina era el medicamento de elección para tratar infecciones sin complicaciones de la uretra, cérvix y recto, producidas por *N. gonorrhoeae*. Sin embargo y debido a la resistencia emergente a la penicilina, las recomendaciones actuales para la terapia empírica incluyen ceftriaxona, cefixima o una fluoroquinolona como ciprofloxacina u ofloxacina. La espectinomocina, un aminociclitol, no se recomienda más para *N. gonorrhoeae* en los Estados Unidos debido a su alto costo y la disponibilidad de agentes más efectivos.

Es poco común que *N. gonorrhoeae* cause infecciones fuera de las vías genitourinarias, pero ocasionalmente causa infección diseminada, incluyendo artritis séptica. Durante el parto, una mujer puede transmitir *N. gonorrhoeae* al recién nacido, produciendo oftalmia neonatal, una infección de los ojos. Para prevenir esta enfermedad, los médicos administran colirios de nitrato de plata, eritromicina o tetraciclina a todos los neonatos en los Estados Unidos y en algunos otros países. Este tratamiento también prevendrá la oftalmia neonatal causada por *Chlamydia trachomatis*.

CASO DE ESTUDIO—*N. GONORRHOEAE*

Un soldado de 21 años de edad, al regresar a los Estados Unidos del Sudeste de Asia, acudió al servicio local de emergencia quejándose de dolor al orinar y una descarga purulenta por sus vías genitales. Se tomaron muestras uretrales para detectar *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*, utilizando métodos basados en ADN. El paciente recibió una dosis única de 500 mg de ciprofloxacina por vía oral. Las pruebas fueron positivas para *N. gonorrhoeae* pero negativas para *C. trachomatis*. A los dos días, el paciente regresó al servicio de emergencia porque sus síntomas no mejoraron.

¿Que prueba/s sería/n la/s más apropiada/s a realizar?

Puesto que el paciente ha terminado recientemente una misión en el Sudeste de Asia donde *N. gonorrhoeae* resistente a fluoroquinolonas es prevalente, y no ha respondido a la terapia inicial, el médico estaba preocupado de que el paciente tuviera un aislamiento resistente a fluoroquinolonas. Se repitió el cultivo y el aislamiento se envió al departamento estatal de salud para una prueba de CIM en dilución en agar. Esta vez, se le administró al paciente una sola dosis de cefixima; los síntomas desaparecieron en 48 horas. El departamento estatal de salud reportó una CIM en dilución en agar de ciprofloxacina de 2 µg/mL para el aislamiento de *N. gonorrhoeae* (ver siguiente cuadro).

Reporte de Laboratorio

Fuente del Espécimen: Descarga uretral

Resultados: *N. gonorrhoeae*

Medicamento	CIM (µg/mL)	Interpretación
Ceftriaxone	0,12	S
Ciprofloxacina	2	R
Tetraciclina	≤ 0,25	S

Luego de completar este capítulo, el lector podrá responder a las preguntas de este caso.

Resistencia – Penicilina

La resistencia a la penicilina de *N. gonorrhoeae* se debe a:

- La producción de beta-lactamasa mediada por un plásmido (conocida como *N. gonorrhoeae* productora de penicilinasasa o NGPP) o
- Las proteínas de unión a penicilina alteradas, que son codificadas por genes cromosómicos (conocida como *N. gonorrhoeae* con resistencia mediada por el cromosoma o NGRMC).

La incidencia de cada mecanismo de resistencia en los Estados Unidos (2001):

- NGPP - 2.0%
- NGRMC - 6.4%

Ninguno de los mecanismos anteriores es responsable por la resistencia a cefalosporinas de espectro amplio, como ceftriaxona o cefixima. La resistencia de *N. gonorrhoeae* a estas cefalosporinas todavía no se ha documentado.

Resistencia-Otros Agentes

- La resistencia de *N. gonorrhoeae* a tetraciclina es usualmente mediada por un plásmido, pero también puede ser mediada por el cromosoma.
- La resistencia a las fluoroquinolonas no es común en los Estados Unidos; sin embargo, porcentajes altos (hasta del 80%) de organismos resistentes a fluoroquinolonas, se han identificado en otras áreas geográficas, particularmente en el Sudeste de Asia.
- La resistencia a espectinomicina es baja en los Estados Unidos y en el extranjero.

Estrategia de Prueba—*N. gonorrhoeae*

El Cuadro 1A del documento M100 del NCCLS provee sugerencias útiles para desarrollar una estrategia de prueba. No se enumeran medicamentos dentro de los Grupos A y B, ya que las pruebas de rutina de *N. gonorrhoeae* no son recomendadas por el NCCLS. Los medicamentos que serían apropiados para pruebas en situaciones seleccionadas se enumeran en el Grupo C.

Nota: El CDC realiza una vigilancia permanente del desarrollo y diseminación de la resistencia antimicrobiana de *N. gonorrhoeae*, utilizando una red de laboratorios ubicados a lo largo y ancho de los Estados Unidos. Estos esfuerzos de monitoreo ayudan a evaluar la necesidad periódica de introducir cambios en las recomendaciones para la terapia empírica de las infecciones gonocócicas.

Estándares de Prueba—*N. gonorrhoeae*

El NCCLS tiene estándares específicos de prueba para *N. gonorrhoeae*.

Método ^a	Medio	Incubación	
		Tiempo (h)	Atmósfera
Difusión por disco	Agar ^b + 1% complemento definido	20–24	CO ₂ (5%)
Dilución agar CIM ^c	Agar + 1% complemento definido	20–24	CO ₂ (5%)

^a Para estos procedimientos consulte los capítulos sobre Difusión por disco y CIM.

^b GC base de agar con 1% de complemento definido. Es similar en apariencia al agar Mueller-Hinton.

^c Cuando el método de dilución en agar es utilizado para carbapenemes o clavulanato, el GC base de agar con 1% complemento definido debe estar libre de cisteína, porque la cisteína interfiere con la prueba de estos agentes. No hay problema con la cisteína en la prueba de difusión por disco.

Interpretación de resultados—*N. gonorrhoeae*

Interpretación del halo de penicilina:

Los halos de penicilina con diámetros más pequeños, por ejemplo 19 mm, sugieren resistencia mediada por beta-lactamasa. Halos más grandes, por ejemplo >20 mm, son probablemente más bien el resultado de resistencia mediada por el cromosoma. La resistencia a la penicilina mediada por el cromosoma generalmente produce menores CIMs que la resistencia mediada por beta-lactamasa.

Criterios de interpretación:

- El Cuadro 2F del documento M100 del NCCLS contiene criterios de interpretación para *N. gonorrhoeae* tanto en los capítulos de difusión por disco y de CIM.
- Para varias cefalosporinas de espectro amplio, solo existen criterios de interpretación para “susceptible”. La resistencia a estos agentes en las *N. gonorrhoeae* no se ha reportado hasta la fecha o es extremadamente rara.

Sugerencia técnica: Si usted encuentra una cepa de *N. gonorrhoeae* que no es susceptible a cefotaxima o cualquier otro medicamento con criterios de interpretación de “susceptible”:

- Confirme la identificación y los resultados de la prueba de susceptibilidad.
- Envíe el aislamiento a un laboratorio de referencia para confirmación según el método de referencia de dilución en agar del NCCLS.
- Guarde el aislamiento.

Control de calidad—*N. gonorrhoeae*

Revise el Capítulo 6 de este manual para obtener instrucciones específicas sobre pruebas de CC para *N. gonorrhoeae*.

La cepa para el CC recomendada por el NCCLS es:

N. gonorrhoeae ATCC 49226

Esta es una cepa con resistencia a la penicilina mediada por el cromosoma que también da resultados de resistencia intermedia a tetraciclina.

NEISSERIA MENINGITIDIS

Antecedentes

N. meningitidis continúa causando enfermedades tanto epidémicas como esporádicas alrededor del mundo. *N. meningitidis* puede causar neumonía o enfermedades sistémicas como meningitis y bacteriemia, con tasas de mortalidad relativamente altas.

La enfermedad diseminada requiere tratamiento inmediato con una cefalosporina de espectro amplio o cloramfenicol.

Debido a que la *N. meningitidis* puede ser altamente contagiosa, los contactos cercanos al paciente infectado son tratados profilácticamente con rifampicina, una fluoroquinolona, o ceftriaxona.

Una vacuna meningocócica que es activa principalmente contra los serotipos A y C, está disponible para poblaciones de alto riesgo.

CASO DE ESTUDIO—*N. MENINGITIDIS*

Un jugador de fútbol de 19 años de edad se enfermó y dejó el entrenamiento antes de terminarlo. Él fue a su residencia, durmió por varias horas pero se levantó sintiéndose con fiebre, confuso y desorientado. Él fue llevado al servicio de emergencia, donde los médicos descubrieron un eritema petequial en la mayor parte de su cuerpo.

Los síntomas del paciente sugirieron un diagnóstico de meningitis meningocócica. Se tomó una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) para realizar una tinción de Gram y un cultivo, y se inició al paciente en una terapia con ceftriaxona. El reporte final (ver siguiente cuadro) se emitió sin los resultados de susceptibilidad.

Reporte de Laboratorio

Fuente del espécimen: LCR

Tinción Gram directa: Diplococos gram-negativos escasos

Glóbulos blancos abundantes

Reporte del Cultivo: Neisseria meningitidis

¿Por qué el laboratorio no realizó las pruebas de susceptibilidad en este aislamiento?

Luego de completar este capítulo, el lector podrá responder a esta pregunta.

Resistencia a la penicilina vs. susceptibilidad disminuida

A pesar de que no se han estandarizado los criterios de interpretación de CIM para *N. meningitidis*, los criterios de interpretación aceptados generalmente para penicilina son:

- Susceptible <0,06 µg/mL
- Intermedio 0,1-1 µg/mL
- Resistente >2,0 µg/mL

A comienzos de los años ochenta, cuatro aislamientos de *N. meningitidis* productores de beta-lactamasa fueron reportados: dos en África del Sur, uno en Canadá y otro en España. Las CIMs de penicilina para los cuatro organismos fueron >128 µg/mL. Dos aislamientos adicionales productores de beta-lactamasa de España han sido descritos recientemente.

Los aislamientos con “susceptibilidad reducida” a la penicilina (algunas veces llamados “resistentes relativos” o “insensibles”) han sido reportados en la literatura.

Estas cepas:

- Presentan CIMs de penicilina que van de 0,1 a 1,2 µg/mL.
- Al parecer tienen una proteína de unión a penicilina tipo 2 (PBP 2) alterada, que es responsable por la susceptibilidad reducida.
- Permanecen susceptibles a cefalosporinas de espectro amplio.
- Son poco comunes.

Resistencia—Otros Agentes

La resistencia a ceftriaxona no ha sido reportada en *N. meningitidis*. Hasta finales del 2004, una susceptibilidad reducida a las fluoroquinolonas ha sido identificada solo en cuatro aislamientos. La resistencia a cloramfenicol ha sido documentada pero es poco común. La resistencia de *N. meningitidis* a rifampicina también es poco común y esta podría deberse a una de las siguientes causas:

Mutaciones en el gene de la ARN polimerasa (*rpoB*)

Disminuciones en la permeabilidad del medicamento para entrar a la célula

La resistencia a las sulfonamidas ocurre con frecuencia. Con la disponibilidad de alternativas más deseables, las sulfonamidas ya no se recomiendan para la profilaxis.

Estrategia de Prueba—*N. meningitidis*

A pesar que el NCCLS sugiere un método de prueba para susceptibilidad antimicrobiana (en el documento M100, Cuadro 7), no hay recomendaciones para el CC de los organismos, ni criterios de interpretación para los resultados de *N. meningitidis*.

Puesto que la enfermedad meningocócica es tratada empíricamente con medicamentos que continúan siendo efectivos, por el momento no es necesario realizar pruebas de rutina. Sin embargo, para casos en que se sospecha el fracaso del tratamiento, los aislamientos deben ser probados con uno de los métodos sugeridos por el NCCLS.

Estándares de Prueba—*N. meningitidis*

El NCCLS tiene métodos estándar definidos para pruebas de *N. meningitidis*.

Método	Medio	Incubación	
		Tiempo (h)	Atmósfera
Dilución en caldo	MH-LHB*	24	35°C, CO ₂ (5%)
Dilución en agar	SB-MHA**	24	35°C, CO ₂ (5%)

* Caldo Mueller-Hinton con ajuste de cationes conteniendo 2–5% (v/v) de sangre lisada de caballo.

** SB-MHA. Agar Mueller-Hinton conteniendo 5% de sangre de cordero.

Pruebas y reportes de los resultados de CIM de los beta-lactámicos—*N. meningitidis*

Cuando se analizan aislamientos de *N. meningitidis* de LCR, algunos laboratorios usan los criterios de interpretación para neumococos como una guía tentativa para penicilina y cefalosporinas. Esto se debe a que los criterios de *S. pneumoniae* están basados en los niveles de LCR, y el NCCLS no tiene criterios de interpretación para *N. meningitidis*. Sin embargo, un comentario importante es que no existen criterios estándares.

Los médicos deben obtener ayuda de especialistas en enfermedades infecciosas cuando usen los resultados de CIM que carezcan de criterios de interpretación. Para entender los resultados, los médicos deben recurrir a la literatura o a colegas experimentados.

Interpretación de resultados—*N. meningitidis*

Si su laboratorio realiza pruebas de susceptibilidad en *N. meningitidis*, los resultados que reporte deben ser cualificados (ver ejemplo de reporte a continuación).

Reporte de Laboratorio

Fuente del Espécimen: LCR

Tinción Gram directa: Diplococos gram-negativos escasos

Glóbulos blancos abundantes

Reporte de cultivo: *Neisseria meningitidis*

Medicamento	CIM (µg/mL)
Ceftriaxone	≥ 0,03
Penicilina	0,25

Comentarios: Los resultados de susceptibilidad son presuntivos; no hay criterios de interpretación disponibles para *N. meningitidis*.

Control de calidad—*N. meningitidis*

El NCCLS no ha descrito una cepa estándar para el control de calidad de *N. meningitidis*. El CC del sistema de prueba (dilución en agar o microdilución en caldo) debe ser realizado usando *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

**MORAXELLA CATARRHALIS
ANTECEDENTES**

Frecuentemente, *M. catarrhalis* esta asociada con infecciones del tracto respiratorio, adquiridas en la comunidad. Sin embargo, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* son la causa más frecuente de estas infecciones.

M. catarrhalis podría causar sinusitis, otitis media, bronquitis y neumonía. La enfermedad sistémica por *M. catarrhalis* es rara. Los agentes usados típicamente para tratar infecciones por *M. catarrhalis* incluyen amoxicilina-ácido clavulánico, trimethoprim-sulfamethoxazol, cefalosporinas orales, macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas.

Las pruebas de susceptibilidad usualmente no son necesarias.

CASO DE ESTUDIO—*M. CATARRHALIS*

Una profesora de 32 años de edad requirió atención médica después de dos semanas de cefaleas relacionadas con los senos paranasales que fueron empeorando progresivamente y descarga nasal purulenta. El médico solicitó un cultivo y envió a la paciente a su casa con un tratamiento de amoxicilina-ácido clavulánico. El reporte de laboratorio (ver a continuación) indicó *M. catarrhalis*. Los síntomas de la paciente mejoraron dentro de las siguientes 24 horas y ella tuvo una recuperación completa en seis días.

Reporte de Laboratorio

Fuente del Espécimen: drenaje de senos paranasales

Resultados: *Moraxella catarrhalis*

¿En este caso, es útil la prueba de susceptibilidad para *M. catarrhalis*? Luego de completar este capítulo, podrá responder a esta pregunta.

Resistencia – beta-lactamasas – *M. catarrhalis*

Entre 85 y 95% de los aislamientos clínicos de *M. catarrhalis* en humanos producen una beta-lactamasa. Las beta-lactamasas de *M. catarrhalis* usualmente son BRO-1 o BRO-2. Estas difieren de la beta-lactamasa TEM-1, que es un tipo muy común en muchas bacterias.

No todas las pruebas de beta-lactamasa son satisfactorias para detectar las beta-lactamasas producidas por *M. catarrhalis*. El método cromogénico de cefalosporina ha sido el más confiable.

La resistencia de *M. catarrhalis* a otros agentes que se considerarían para tratar infecciones de vías respiratorias es poco común.

Estrategia de Prueba—*M. catarrhalis*

No existe un método estándar del NCCLS para pruebas y reportes de susceptibilidad antimicrobiana de *M. catarrhalis*.

Puesto que *M. catarrhalis* es generalmente asociada con infecciones del tracto respiratorio y es típicamente susceptible a los agentes que se prescriben, no es necesario realizar pruebas de rutina de susceptibilidad. A pesar que la mayoría de *M. catarrhalis* son beta-lactamasa positivas, algunos laboratorios realizan la prueba de beta-lactamasa y reportan los resultados para educar aún más a los médicos sobre lo inadecuado que resulta la terapia con penicilinas susceptibles a la beta-lactamasa (Eje. ampicilina, amoxicilina y penicilina).

REVISIÓN**Recuerde:**

- Usar los estándares más actualizados M2 y M7 del NCCLS para las pruebas de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*. Los estándares M100 son actualizados anualmente y contienen los cuadros más recientes y sugerencias para los reportes.
- Mantener una conciencia sobre los temas de resistencia de *N. gonorrhoeae* en su comunidad y sugerir cultivos y pruebas de susceptibilidad para pacientes en donde la terapia esté fracasando.
- Realizar pruebas de CIM en dilución en caldo o en agar de *N. meningitidis* aislados de sitios del cuerpo normalmente estériles o enviar el aislamiento a un laboratorio de referencia para su análisis, cuando sean específicamente solicitadas por un médico.
- Abstenerse de realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de *M. catarrhalis* porque no hay lineamientos del NCCLS para realizarlas y los resultados de las pruebas de susceptibilidad no son necesarios para la atención al paciente.

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

1. Cuál de las siguientes frases es verdadera con relación a la ausencia de medicamentos en los Grupos A y B para *N. gonorrhoeae* en el Cuadro 1A del documento M100 del NCCLS? Seleccione todas las opciones que apliquen.
 - A. No es necesario probar rutinariamente los medicamento contra *N. gonorrhoeae*.
 - B. La única prueba que se necesita es la de beta-lactamasa.
 - C. Los métodos de prueba para *N. gonorrhoeae* no han sido estandarizados.

2. ¿Cuál método de preparación del inóculo debe ser usado para la prueba de CIM en dilución en agar o la prueba de difusión por disco?
 - A. Estandarización directa
 - B. Crecimiento en la fase logarítmica
 - C. Crecimiento en la fase estacionaria
3. ¿Deben todos los laboratorios clínicos realizar rutinariamente la prueba de beta-lactamasa de *N. gonorrhoeae*?
 - A. Sí
 - B. No
4. Refiriéndonos al caso de estudio en el cual el paciente no respondió a ciprofloxacina, ¿Qué pruebas son necesarias ahora?
 - A. Repetir la prueba directa solo para *N. gonorrhoeae*.
 - B. Solo el cultivo de *N. gonorrhoeae*.
 - C. Cultivo y pruebas de susceptibilidad de *N. gonorrhoeae*.
5. ¿Qué fundamento podría dar el laboratorio para NO realizar pruebas rutinarias de susceptibilidad en *N. gonorrhoeae*? Seleccione todas las opciones que apliquen.
 - A. Todas las *N. gonorrhoeae* son susceptibles a la penicilina, por lo tanto es innecesario realizar la prueba.
 - B. Las infecciones genitales sin complicaciones de *N. gonorrhoeae* son tratadas usualmente empíricamente y típicamente responden al tratamiento.
 - C. El análisis de rutina usando métodos basados en ADN, elimina la necesidad de un aislamiento para pruebas de susceptibilidad.
6. Con base en los patrones de resistencia y susceptibilidad descritos en este capítulo, ¿Qué agente podría ser usado para el tratamiento de infecciones sistémicas causadas por *N. meningitidis*?
 - A. Cefalosporina de espectro amplio
 - B. Cloramfenicol
 - C. Penicilina
 - D. Sulfonamidas
7. Con base en el reporte de laboratorio del caso de estudio (descrito arriba) de *N. meningitidis* ¿Qué razones potenciales podría citar el laboratorio para no realizar las pruebas de susceptibilidad en este aislamiento? Seleccione todas las que apliquen.
 - A. *N. meningitidis* continúa siendo universalmente susceptible a ceftriaxona.
 - B. El laboratorio no tenía acceso a reactivos para la prueba de beta-lactamasa, que es la mejor manera de probar la resistencia de *N. meningitidis* a la penicilina.
 - C. *N. meningitidis* es muy fastidiosa y no se puede crecer con facilidad en el laboratorio.
 - D. No hay criterio de interpretación estándar del NCCLS para *N. meningitidis*.
8. Al revisar el caso de estudio de *M. catarrhalis*, ¿Por qué no es necesario realizar pruebas de rutina de susceptibilidad en este organismo?
 - A. *M. catarrhalis* crece pobremente en todos los medios usados para las pruebas de susceptibilidad.
 - B. Las infecciones por *M. catarrhalis* no requieren terapia antimicrobiana.
 - C. Las infecciones por *M. catarrhalis* generalmente responden a la terapia empírica.

OBJETIVOS

Al finalizar este capítulo el lector deberá ser capaz de:

- Discutir sobre una estrategia para obtener los mejores resultados en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en anaerobios aislados en su laboratorio.
- Describir donde encontrar las recomendaciones para realizar las pruebas de CIM en bacterias anaeróbicas, incluyendo la preparación del inóculo, el medio de cultivo a utilizar, y la atmósfera y duración de incubación.
- Enumerar aquellas situaciones en las cuales se debe realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos anaeróbicos.

ANTECEDENTES

Las bacterias anaeróbicas son parte de la flora endógena de la piel, el tubo digestivo y las vías urinarias. Aproximadamente se encuentran 100 especies diferentes de anaerobios en muestras clínicas. En el colon, los anaerobios superan a los aerobios en 1000 a 1, y en la saliva la razón es 10 a 1.

Los anaerobios estrictos, tales como *Fusobacterium*, *Prevotella* y *Porphyromonas* spp., podrían no sobrevivir a la exposición al aire por más de 10-30 minutos. Los aislamientos de este género se encuentran en todo el cuerpo y podrían estar involucrados en una variedad de infecciones que abarcan desde abscesos cerebrales hasta úlceras de pie diabético.

Los *Actinomyces* y *Propionibacterium* spp. son relativamente tolerantes al aire y están típicamente involucrados en infecciones de la piel y la cavidad oral. Algunos aislamientos de *Bacteroides* y *Clostridium* spp. también pueden ser tolerantes al aire y por lo general se encuentran en infecciones de tejidos normalmente estériles adyacentes al tubo digestivo y de tejidos blandos por debajo de la cintura.

Un tercio de los anaerobios aislados de muestras de rutina enviadas al laboratorio clínico de microbiología forma parte del grupo *Bacteroides fragilis* (incluyendo *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. distasonis* y otras siete especies), otro tercio es *Peptostreptococcus* spp. y el tercio restante incluye *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Clostridium* spp. y los bastones gram-positivos no formadores de esporas.

Las clásicas infecciones anaeróbicas incluyen gangrena gaseosa causada por *Clostridium perfringens* y otros *Clostridium* spp., tétanos causada por *Clostridium tetani* y botulismo causada por *Clostridium botulinum*. La mayoría de infecciones anaeróbicas son por lo general polimicrobianas. El manejo de las infecciones anaeróbicas incluye drenaje quirúrgico de pus, remoción de tejido necrótico y administración de agentes antimicrobianos contra aerobios y anaerobios. Debido a que algunos anaerobios crecen lentamente y los resultados de cultivos de anaerobios y

las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por lo general toman varios días, la terapia es generalmente empírica.

Las infecciones anaerobias se tratan usualmente con agentes antimicrobianos de espectro extendido, los que tienen actividad contra una variedad de especies anaerobias. Los agentes más comúnmente utilizados incluyen ampicilina-sulbactam, cefoxitina, imipenem, metronidazol y piperacilina-tazobactam.

El cloranfenicol mantiene una alta actividad contra la mayoría de anaerobios, pero es prescrito con poca frecuencia en los Estados Unidos debido a sus potenciales efectos colaterales. La clindamicina también es usada para tratar infecciones anaeróbicas, pero la resistencia emergente dentro del grupo de *B. fragilis* y la disponibilidad de agentes con baja resistencia ha limitado su uso en los últimos años.

CASO DE ESTUDIO

Una mujer de 85 años de edad fue admitida en el hospital por presentar intenso dolor abdominal y fiebre de 39° C. Se tomaron dos muestras de sangre para cultivo y se inició tratamiento antibiotico con cefoxitina y gentamicina. La paciente fue intervenida quirúrgicamente y se descubrió un divertículo roto.

En el segundo día de hospitalización de la paciente, los cultivos de sangre presentaron crecimiento de bacilos gram-negativos. La paciente continuó con fiebre y en el tercer día su terapia se cambió a piperacilina-tazobactam. Mas tarde en ese día, el subcultivo anaeróbico de los cultivos de sangre reveló crecimiento de colonias típicas del grupo de *B. fragilis* mientras que las placas aeróbicas no presentaron crecimiento. Las colonias anaeróbicas fueron negativas en la prueba de indol, pero catalasa positiva. Horas después se identificó al organismo como *B. fragilis* utilizando una prueba comercial.

El laboratorio no realiza pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias anaeróbicas, pero tiene una política de envío de los aislamientos a un laboratorio de referencia si la prueba es solicitada por un especialista en enfermedades infecciosas y aprobada por el director del laboratorio de microbiología. El infectólogo solicitó que este *B. fragilis* sea enviado al laboratorio de referencia para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

¿Será posible que el director del laboratorio apruebe este pedido?

Resistencia – Penicilinas

Más del 99% de aislamientos del grupo de *B. fragilis* son resistentes a la penicilina. La mayoría produce beta-lactamasa; sin embargo, algunas cepas son resistentes debido a cambios en las proteínas unión a penicilinas (PBPs) que se encuentran en la membrana citoplasmática de la bacteria. Aproximadamente el 50% de *Prevotella* spp. produce beta-lactamasa. La producción de beta-lactamasa en otras especies gram-negativas anaeróbicas es poco común.

La resistencia a la penicilina entre las bacterias gram-positivas anaeróbicas ocurre con poca frecuencia. Ocasionalmente cepas de algunos *Clostridium* spp. producen beta-lactamasa.

Resistencia – Cefemes & Otros Beta-Lactámicos

Las cefalosporinas de primera y segunda generación tienen limitada actividad contra las bacterias anaeróbicas que se encuentran en muestras clínicas. Sin embargo, las cefamicinas, incluyendo cefoxitina y cefotetan, son activas contra los anaerobios. La cefoxitina es generalmente más activa que cefotetan contra los aislamientos del grupo de *B. fragilis*.

In vitro, ceftizoxima, ceftriaxone y cefotaxima tienen limitada actividad contra los anaerobios; sin embargo, ceftizoxima parece ser efectiva para tratar infecciones intra-abdominales. Ceftazidima y cefepime poseen una pobre

actividad contra la mayoría de los anaerobios. La combinación de agentes inhibidores de beta-lactamasa, incluyendo ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam y ticarcilina-ácido clavulánico, son activos contra la mayoría de bacterias anaeróbicas, incluyendo las del grupo de *B. fragilis*, que son productoras de beta-lactamasa. El imipenem permanece altamente activo contra los anaerobios.

Resistencia – Quinolonas

Las fluoroquinolonas más antiguas, incluyendo ciprofloxacina y ofloxacina, tienen una pobre actividad contra las bacterias anaeróbicas.

Algunas de las fluoroquinolonas más nuevas, como gatifloxacina, levofloxacina y moxifloxacina, son consideradas activas contra una variedad de especies anaeróbicas, a pesar que los datos en la literatura son escasos. La resistencia ocurre en algunos aislamientos del grupo de *B. fragilis* y *Clostridium* spp. diferentes a *C. perfringens*.

Resistencia – Otros Agentes

Debido a que los aminoglucósidos requieren oxígeno para su transporte dentro de las células bacterianas, ninguno de estos agentes es activo contra los anaerobios.

El metronidazol es muy activo contra los anaerobios, pero no tiene ninguna actividad contra las bacterias aeróbicas o los anaerobios tolerantes al aire, tales como *Actinomyces* y *Propionibacterium* spp.

Históricamente, la clindamicina fue una de las primeras opciones para tratar infecciones anaeróbicas. Sin embargo, dada la creciente resistencia, particularmente entre los aislamientos del grupo de *B. fragilis* y algunos clostridios, ya no se recomienda como el medicamento de primera elección para tratar infecciones anaeróbicas. Aproximadamente entre 15-20% de aislamientos de *B. fragilis* y 50% de aislamientos del grupo de *B. fragilis* son resistentes a clindamicina. Muchos clostridios y algunos peptostreptococos y *Prevotella* spp. son también resistentes a clindamicina.

El cloranfenicol se mantiene altamente activo contra los anaerobios.

Muchos anaerobios son resistentes a tetraciclina; sin embargo, la doxiciclina y minociclina podrían mostrar actividad contra una variedad de especies.

Estrategias de Prueba

El NCCLS provee estándares para pruebas de bacterias anaeróbicas en el documento M11 bajo el título “Métodos para Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana de Bacterias Anaeróbicas.”

En este documento el NCCLS recomienda las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana cuando las decisiones de terapia son críticas. Estas incluyen:

- Organismos con resistencia antimicrobiana conocida.
- Pacientes cuyas infecciones persisten a pesar de un tratamiento adecuado con los agentes antimicrobianos apropiados.
- Situaciones en las cuales la terapia empírica para infecciones anaeróbicas severas no está clara debido a los múltiples sitios de infección o a la carencia de experiencia clínica con estos tipos de infecciones.

Razones adicionales para realizar pruebas de aislamientos clínicos:

- Confirmar la terapia apropiada de infecciones severas o para aquellas que requieran terapia de largo plazo.
- Monitoreo periódico de los patrones de resistencia local y regional.
- Determinar patrones de susceptibilidad de los anaerobios a nuevos agentes antimicrobianos.

Estrategia de Prueba – Pruebas de Rutina

El NCCLS proporciona ejemplos de situaciones específicas cuando son necesarias las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

Estas incluyen situaciones en las cuales se han aislado anaerobios de:

- Abscesos cerebrales
- Endocarditis
- Osteomielitis
- Infecciones articulares
- Infecciones que involucran dispositivos de prótesis o injertos
- Bacteriemia

Los aislamientos de sitios del cuerpo normalmente estériles deben ser analizados a menos que se piense que son contaminantes.

Los anaerobios que se conocen como causa de infecciones en humanos y que tienen perfiles impredecibles de susceptibilidad incluyen *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Bilophila* y *Sutterella* spp. Cuando estos organismos son aislados de muestras clínicas significativas las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana deben ser realizadas.

Métodos

El documento M11 del NCCLS describe los estándares específicos para analizar anaerobios utilizando ya sea procedimientos de CIM de dilución en agar o microdilución en caldo. La dilución en agar puede ser usada para todos los anaerobios que crecen satisfactoriamente en este sistema de prueba. La microdilución en caldo es recomendada solo para *B. fragilis*.

El Cuadro 1 en el documento M11 incluye sugerencias para la selección de agentes antimicrobianos para pruebas contra bacterias anaeróbicas. Estos están divididos en los de primera elección y los de elección complementaria.

Los métodos de CIM de microdilución en caldo y dilución en agar que se han descrito para anaerobios son similares a aquellos para los aerobios. Las recomendaciones específicas para las pruebas de CIM para bacterias anaeróbicas incluyen:

Preparación del inóculo:

- Use el método de suspensión directa de colonias y el estándar 0,5 de McFarland.
- La concentración final del inóculo para microdilución en caldo es $1-2 \times 10^6$ UFC/mL.
- El inóculo final para dilución en agar es 10^5 UFC/sitio.

NOTA: El inóculo para pruebas de CIM anaeróbicas es mayor que para las pruebas de CIM aeróbicas.

Medio:

- Microdilución en caldo: caldo de Brucella + vitamina K1 + hemina + sangre de cordero lacada
- Dilución en agar: agar Brucella + vitamina K1 + hemina + sangre de cordero lacada

Incubación

- 48 horas de incubación a 35°C en un ambiente anaeróbico (cámara, frasco o bolsa)

Métodos – Notas Adicionales

Al momento, las recomendaciones del NCCLS no incluyen un paso de pre-reducción para placas de agar o microdilución en caldo de las bandejas de CIM antes de realizar la prueba. Esto podría cambiar, particularmente si futuras recomendaciones para pruebas de microdilución en caldo toman en cuenta especies adicionales más allá del grupo de *B. fragilis*.

El caldo Brucella y el agar Brucella apoyan el crecimiento de anaerobios encontrados en muestras clínicas que requieren pruebas de susceptibilidad. **Debido a que no todos los fabricantes usan los mismos ingredientes para la base de Brucella, la fórmula es provista en el documento M11.**

Como con las pruebas de CIM de aerobios, es esencial realizar un control de pureza del inóculo inmediatamente después de la inoculación de la prueba de microdilución en caldo de CIM. Una muestra del inóculo debe ser subcultivada en dos placas, una incubada anaeróbicamente y la otra aeróbicamente. Para las pruebas de dilución en agar, placas libres de medicamentos deben ser inoculadas para incubación de bacterias aeróbicas y anaeróbicas después de cada grupo de placas que contengan medicamentos.

Puesto que todas las bacterias anaerobias gram-negativas son esencialmente susceptibles a metronidazol, un resultado de resistente siempre debe ser confirmado.

Métodos—Prueba de Beta-Lactamasa

Los miembros del grupo de *B. fragilis* producen beta-lactamasa y son resistentes a las penicilinas lábiles a la penicilinas (eje. ampicilina, penicilina). Sin embargo, las pruebas de beta-lactamasa pueden ser realizadas en otras bacterias anaeróbicas gram-negativas y gram-positivas si se considera terapia con penicilina.

El método de la cefalosporina cromogénica debe ser usado para pruebas de beta-lactamasa en anaerobios. Para obtener detalles de este procedimiento consulte el Capítulo 2, “Beta-lactamasas.”

Los aislamientos beta-lactamasa positivos deben ser considerados resistentes a ampicilina y penicilina. Algunos anaerobios (incluyendo cepas de *B. fragilis* y *B. distasonis*) podrían ser resistentes a ampicilina y penicilina por un mecanismo diferente a la producción de beta-lactamasa. Por tanto, un resultado de beta-lactamasa negativo no garantiza susceptibilidad a los beta-lactámicos. Si se considera terapia con ampicilina o penicilina, se debe realizar una prueba de CIM.

Métodos—Interpretación de Resultados

Los resultados de CIM son interpretados como sensible, intermedio o resistente utilizando los criterios de interpretación específicos para anaerobios que constan en el documento M11 del NCCLS. Las interpretaciones son válidas sólo si las pruebas

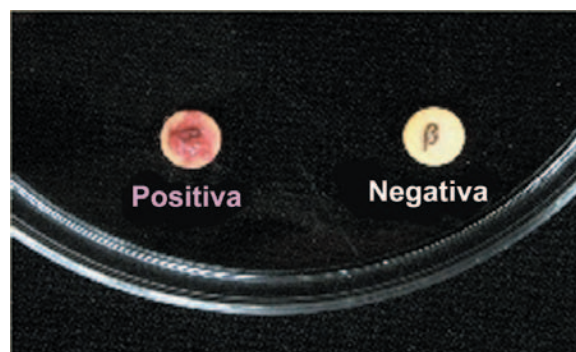


Figura 16.1—Prueba positiva y negativa de beta-lactamasas

son realizadas conforme a las recomendaciones del NCCLS o por un procedimiento que produce resultados comparables al método del NCCLS.

Muchos resultados de CIM del grupo de *B. fragilis* forman conglomerados alrededor del límite de susceptibilidad. Esto es especialmente cierto para las cefamicinas y la clindamicina. También, algunos límites de CIM son difíciles de leer. La categoría intermedia provee una zona de reducción que ayuda a prevenir que errores de interpretación sean reportados como falso susceptible o falso resistente.

Control de Calidad

Revise el Capítulo 6 AC/CC de este manual para obtener instrucciones específicas sobre pruebas de CC para anaerobios.

Las cepas de CC recomendadas por el NCCLS para pruebas de CIM de bacterias anaeróbicas de microdilución en caldo y dilución en agar son:

Bacteroides fragilis ATCC 25285

Bacteroides thetaiotaomicron ATCC 29741

Egerthella (Eubacterium) lentum ATCC 43055

Para las pruebas de microdilución en caldo, al menos una de las cepas de CC debe ser incluida en cada serie de pruebas. El aislamiento seleccionado debe tener límites en escala para los medicamentos probados.

Para las pruebas de dilución en agar, al menos dos cepas de CC deben ser incluidas en cada serie de pruebas. El almacenamiento de largo plazo de las cepas de CC para anaerobios es similar al de aerobios.

COMENTARIO AL CASO DE ESTUDIO

Ahora usted debe estar en capacidad de predecir la respuesta del director del laboratorio de microbiología al pedido del infectólogo de realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en el aislamiento de *B. fragilis* de la sangre de la paciente anciana.

¿Será posible que el director del laboratorio apruebe este pedido? (Respuesta correcta: A)

- A. Sí
- B. No

El director del laboratorio aprobó la solicitud y el aislamiento se envió a un laboratorio de referencia que realiza pruebas de susceptibilidad usando el método del NCCLS de microdilución en caldo de CIM. Se recibió el siguiente reporte:

Reporte de Laboratorio

Fuente del Espécimen: sangre

Resultados: *Bacteroides fragilis*

	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Interpretación
Ampicilina-sulbactam	8	S
Cefotetan	>64	R
Cefoxitina	>64	R
Cloranfenicol	8	S
Imipenem	0,5	S
Metronidazol	1	S
Penicilina	16	R
Piperacilina-tazobactam	2/4	S

Ahora es más clara la razón por la que el paciente falló en responder a la terapia inicial con cefoxitina y gentamicina. El aislamiento de la cepa de *B. fragilis* del paciente es resistente a cefoxitina. Puesto que los aminoglucósidos no son activos contra los anaerobios, la gentamicina virtualmente no tuvo ningún beneficio. Sin embargo, el *B. fragilis* es susceptible a piperacilina-tazobactam.

REVISIÓN

Ahora el lector debe estar familiarizado/a con las pruebas de rutina de susceptibilidad antimicrobiana y las recomendaciones para reportar bacterias anaeróbicas.

Recuerde:

- Usar los estándares más actualizados del NCCLS (M11) para obtener las instrucciones para pruebas de susceptibilidad de anaerobios y ayuda para desarrollar una estrategia para decidir cuales aislamientos analizar en su laboratorio.
- Cuando use un sistema comercial lea minuciosamente las instrucciones adjuntas y siga las instrucciones del fabricante en forma precisa.
- Identificar un recurso para obtener datos cumulativos de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en anaerobios, particularmente si los datos disponibles de su laboratorio son limitados.
- Si se considera terapia con penicilina advierta que la prueba de beta-lactamasa puede ser útil para aislamientos anaerobios que no sean del grupo de *B. fragilis*. Casi virtualmente todos los aislamientos del grupo *B. fragilis* son beta-lactamasa positivos.

PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN

1. ¿Por qué las infecciones anaeróbicas generalmente son tratadas empíricamente? Seleccione todas las opciones que apliquen.
 - A. Hay muy poca resistencia entre los anaerobios y por lo tanto la mayoría de los agentes antimicrobianos son efectivos para tratar infecciones anaeróbicas.
 - B. Los anaerobios crecen lentamente y los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, que ayudarán a los clínicos a determinar la mejor terapia, se demoran con frecuencia.
 - C. Muchas infecciones anaeróbicas son polimicrobianas, las que necesitan el uso de agentes de amplio espectro dirigidos contra muchas especies de aeróbicos y anaeróbicos.
 - D. Todos los anaerobios son susceptibles a las penicilinas.

2. ¿Para cuál de los siguientes aislamientos se debe realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana? Seleccione todas las opciones que apliquen.
 - A. *Fusobacterium nucleatum*, *B. fragilis* y *C. perfringens* aislados de líquido peritoneal que también dio crecimiento a *E. coli* y *Enterobacter* spp.
 - B. Peptoestreptococos aislados de líquido cefalorraquídeo que también dio crecimiento de estafilococos coagulasa-negativo y *Corynebacterium* spp.
 - C. *Clostridium septicum* de un cultivo de sangre
 - D. *Bacteroides thetaiotaomicron* de líquido pleural.
3. ¿Parecen razonables los resultados del reporte de laboratorio que se presenta a continuación para un *B. fragilis*?

Reporte de Laboratorio

Fuente del espécimen: sangre

Resultados *Bacteroides fragilis*

	CIM (µg/mL)	Interpretación
Ampicilina-sulbactam	8	S
Cefotetan	8	S
Cefoxitina	8	S
Cloranfenicol	8	S
Imipenem	0,5	S
Metronidazol	>32	R
Penicilina	16	R
Piperacilina-tazobactam	2/4	S

4. ¿Por qué se debe realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en *B. fragilis* aislado de la sangre de una mujer anciana? Seleccione todas las opciones que apliquen.
 - A. Los aislamientos del grupo de *B. fragilis* tienen patrones de susceptibilidad variables a los agentes antimicrobianos comúnmente prescritos para tratar infecciones anaeróbicas.
 - B. La paciente no respondió como se esperaba a la terapia antimicrobiana inicial y la intervención quirúrgica. Esto sugiere que el aislamiento de la paciente podría haber sido resistente a los agentes prescritos.
 - C. La bacteriemia anaeróbica es una enfermedad muy seria.
5. ¿Cuál sería un número razonable de pruebas de susceptibilidad anaeróbica por mes para justificar la realización de la prueba dentro de su laboratorio?
 - A. Cualquier número
 - B. 5
 - C. 20
6. Si su laboratorio obtiene con poca frecuencia resultados de susceptibilidad en aislamientos anaeróbicos, ¿Cómo podría determinar si hay resistencia emergente en los aislamientos que infectan a los pacientes en su comunidad? Seleccione todas las opciones que apliquen.
 - A. Obtener información de otras instituciones
 - B. Guardar aislamientos que probablemente que estén contribuyendo a las infecciones de pacientes y realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana una vez al año.

- C. Revisar la literatura.
7. Usted ha aislado *B. fragilis* y un *Peptostreptococcus* spp. de un aspirado de absceso hepático de un hombre de 48 años de edad. ¿Cuál de los aislamientos, debería analizarse para susceptibilidad?
- A. Ninguno
 - B. Ambos
 - C. *B. fragilis*

Respuestas Para Todos Los Capítulos

CAPÍTULO 1—MODOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS

1. Verdadera.
2. B.
3. B, C, D y E.
4. A, C, E y F son verdaderas.
5. A y B.
6. A. (2); B. (3); C. (4); D. (1)
7. A. (2); B. (1); C. (2); D. (1)
8. A. (4); B. (3); C. (1); D. (2)

CAPÍTULO 2—BETA-LACTAMASAS

1. A, C y D son verdaderas
2. A, B, y F

CAPÍTULO 3—NCCLS

1. C. Correcta. NCCLS es una organización privada que reúne a grupos de expertos de industrias, academia y agencias de gobierno en diferentes tópicos y desarrolla lineamientos para pruebas de laboratorio clínico.
2. B. Correcta
3. A. Incorrecta
B. Correcta. Los documentos M2 y M7 proveen instrucciones para los métodos de referencia, y no para sistemas comerciales. Si está usando un sistema comercial para pruebas de CIM, usted debe seguir las instrucciones del fabricante.
4. C. Correcta
5. C. Correcta
6. A. Incorrecta
B. Correcta. Los resultados para ampicilina están fuera de los rangos aceptables. La prueba de ampicilina está ahora funcionando apropiadamente y debe ser investigada antes de entregar los resultados de ampicilina en aislamientos de pacientes. Los resultados de Control de Calidad (CC) para los otros dos antibióticos son aceptables, y, por lo tanto, las pruebas con estos agentes pueden ser reportados en aislamientos de pacientes.
7. A. Incorrecta

- B. Correcta. La penicilina no está enumerada en la columna de *Enterobacteriaceae* debido a que no es efectiva contra miembros de la *Enterobacteriaceae* que incluyen *E. coli*.
8. C. Correcta
9. Verdadero
10. Falso
11. Verdadero

CAPÍTULO 4—PRUEBA DE DIFUSIÓN POR DISCO

1. Verdadero
2. Verdadero
3. Verdadero
4. Falso
5. Método directo en colonias: 18–24; 0,5
Método en fase log: 2–8; 0,5
6. *Enterobacteriaceae*: C
Estafilococos: B
Bacterias fastidiosas: B
7. B. Correcta
8. B. Correcta
9. A. Correcta. Las colonias dentro del halo probablemente representan un cultivo mixto.
B. Correcta. Esta es una explicación menos probable.
C. Incorrecta. La película de crecimiento parece aceptable.
10. C. Correcta. La prueba debe ser repetida con colonias de las placas originales o con un subcultivo de estas.

CAPÍTULO 5—PRUEBAS DE CIM

1. NCCLS documento M7.
2. NCCLS documento M100 S14 (los números más altos en la serie S representan ediciones más recientes).
3. A. El tiempo de incubación debe extenderse a 24 horas para estafilococos con oxacilina y vancomicina y para enterococos con vancomicina y altos niveles de gentamicina y estreptomycin. Si los resultados de resistencia para altos niveles de estreptomycin son negativos incubar por 24 horas más.
B. El punto de corte para trimethoprim, sulfonamidas y trimethoprim-sulfamethoxazol se lee a la concentración que presenta >80% de disminución en el crecimiento.
C. Los agentes bacteriostáticos pueden presentar “trailing” por eso una ligera opacidad o botones de crecimiento <2mm se ignoran. Las excepciones son estafilococos con oxacilina o vancomicina y enterococos con vancomicina.
4. A. Incorrecta
B. Correcta. En la mayoría de situaciones un resultado sensible, intermedio o resistente es suficiente. Sin embargo, algunos clínicos podrían preferir resultados de CIM como orientación para la terapia para enfermedades específicas tales como endocarditis, osteomielitis y artritis séptica.

CAPÍTULO 6—AC/CC

No hay una sección separada con respuestas y comentarios para el Capítulo 6. Todas las respuestas y comentarios están integrados en el texto. Debido al diseño de este Capítulo creemos que los estudiantes y lectores se beneficiarán más teniendo las respuestas y comentarios disponibles inmediatamente.

CAPÍTULO 7—SISTEMAS COMERCIALES

1.
 - A. Incorrecta. El documento M2 describe el método de referencia de difusión por disco.
 - B. Incorrecta. El documento M7 describe los métodos de referencia en caldo y dilución en agar.
 - C. Incorrecta. El documento M100 contiene cuadros con criterios de interpretación y rangos de control de calidad para métodos de difusión por disco y CIM.
 - D. Correcta. La función del NCCLS es desarrollar procedimientos genéricos para pruebas de referencia, esto es, NO para evaluar, apoyar o recomendar sistemas de prueba comerciales para susceptibilidad antimicrobiana.
2.
 - A. Incorrecta
 - B. Incorrecta
 - C. Incorrecta
 - D. Correcta. La E-test es un sistema comercial de prueba de gradiente antibiótico.
3.
 - A. Incorrecta. La limitación significa que el fabricante no ha demostrado que el sistema puede producir resultados precisos para *B. cepacia*. Por tanto, no puede usar el método aun con una aseveración cualificada.
 - B. Incorrecta. Aun si los resultados parecen típicos para esta especie, esto no garantiza que sean precisos. La limitación significa que el fabricante no ha demostrado que el sistema puede producir resultados precisos para *B. cepacia*.
 - C. Correcta.
4.
 - A. Correcta. Es muy importante que el sistema pueda detectar tipos importantes de resistencia, como en ORSA, ERV y BLEEs, que probablemente tengan un impacto clínico.
 - B. Correcta. Si, por ejemplo, su laboratorio realiza muchas pruebas para *P. aeruginosa* debido a que está afiliado con un centro de quemados, es importante realizar pruebas en un número y variedades significativos de aislamientos de *P. aeruginosa* durante su estudio.
 - C. Incorrecta. A pesar que es importante realizar pruebas en una variedad de especies, sería difícil y poco práctico incluir igual número de cada especie y aún probar una buena muestra de aislamientos con tipos seleccionados de resistencia.
 - D. Correcta. La información derivada de las pruebas de aislamientos con CIMs por encima de la concentración más alta o por debajo de la concentración más baja del medicamento probado para un agente específico es menos útil que la información derivada de pruebas de aislamientos con CIMs que se hallan dentro de “la escala” o dentro del rango de concentraciones probadas.
5.
 - A. Correcta. Cuando revise artículos en revistas, tome en cuenta la versión del sistema (materiales y software) que fue evaluada. Si el estudio no se realizó recientemente, es posible que una nueva versión del sistema esté en uso en la actualidad y que su desempeño pueda diferir del reportado en el artículo.
 - B. Correcta. Es importante saber la fuente de los datos publicados en la literatura del fabricante. Tales datos podrían representar estudios no publicados que fueron compilados como parte de la solicitud de aprobación de la FDA.
 - C. Correcta. Muchos encuentran extremadamente valioso discutir el producto con usuarios actuales para obtener información relacionada con el desempeño y el uso en el laboratorio clínico.
 - D. Incorrecta. El NCCLS no provee ninguna información sobre sistemas comerciales de prueba de susceptibilidad antimicrobiana.
6.
 - A. Incorrecta. Probar solo las cepas de CC no garantizará el desempeño satisfactorio con aislamientos clínicos.

- B. Incorrecta. También es necesario evaluar el desempeño del sistema con cepas de CC. Use las cepas de CC recomendadas por el fabricante.
 - C. Incorrecta. Será imposible evaluar apropiadamente el desempeño del sistema en su laboratorio realizando pruebas en solo 20–30 aislamientos clínicos.
 - D. Correcta. Es importante asegurarse que el sistema se desempeña satisfactoriamente con las cepas de CC y produce resultados precisos con aislamientos clínicos. Es esencial garantizar que el sistema puede detectar aislamientos con tipos específicos de resistencia.
- 7.
- A. Correcta. A pesar que la muy alta tasa de error de 10% es excesiva, esto representa solo un error con uno de los aislamientos. Todos los datos disponibles deben ser revisados para evaluar mejor la magnitud del problema.
 - B. Correcta. Es importante determinar si el error es reproducible.
 - C. Correcta. Datos adicionales serían útiles. Es mejor seleccionar ORSA de varias ubicaciones en su institución para reducir la posibilidad de analizar aislamientos del mismo clon.
 - D. Incorrecta. Es importante analizar todos los datos del estudio, a menos que la razón de los datos aberrantes sea conocida (eje., se analizó el organismo errado u ocurrió contaminación esporádica.)
8. La FDA
9. Los datos de su sistema son comparados con los de un método de referencia de dilución como un método de CIM en agar o en caldo. Cientos de cepas de todo el país incluyendo aquellas con resistencia inusual o altos niveles de resistencia a medicamentos relacionados deben ser incluidas en esta evaluación.
10. Los laboratorios deben realizar pruebas internas paralelas del nuevo sistema con un método de referencia del NCCLS como difusión por disco o uno de microdilución en caldo de CIM. Para bacterias no fastidiosas deben analizar un mínimo de 100–200 aislamientos clínicos frescos seleccionados al azar que representen una variedad de especies gram positivas y gram negativas. Las cepas con resistencia conocida también deben analizarse con ambos sistemas. Las cepas de CC deben analizarse con ambos métodos por 30 veces consecutivas.
11. Las instrucciones adjuntas ofrecen al personal de laboratorio amplia información de respaldo así como todos los detalles para usar el sistema. Si las instrucciones adjuntas se siguen en forma precisa, es muy probable que el usuario reciba resultados concurrentes con un método de referencia.
12. Esto informa al usuario sobre organismos así como combinaciones de organismo/medicamento para los cuales no debe usarse el sistema. Pruebas de evaluación previas a la aprobación de la FDA revelaron que los resultados de estos organismos no son confiables.
13. Cualquier método diferente a los de difusión por disco, dilución en agar y macro o micro dilución en caldo. Ejemplos de métodos que no son de referencia incluyen cualquier sistema automatizado o el E-test.
14. Una tira delgada conteniendo un gradiente de antibiótico es rotulada de acuerdo a los niveles que corresponden a las CIMs. Después que la tira se coloca en una placa de agar inoculada recientemente (e incubada durante toda la noche) el antibiótico se difunde de la tira e inhibe el crecimiento sobre el nivel de la tira que se correlaciona con la CIM.

CAPÍTULO 8—STAPHYLOCOCCUS SPP.

1. A. ORSA
B. ORSA
C. BORSA
D. ORSA
E. BORSA
2. A. Correcta
B. Correcta
C. Incorrecta. Los resultados de oxacilina y penicilina pueden usarse para deducir resultados para otros beta-lactámicos, incluyendo cefalosporinas.
3. A. Incorrecta. Los aminoglucósidos no se consideran agentes de primera línea contra estafilococos.
B. Correcta. La clindamicina puede usarse en vez de los macrólidos para infecciones de la piel, especialmente en la presencia de anaerobios.
C. Incorrecta. Pocas veces se analizan rutinariamente; sin embargo, las pruebas pueden ser recomendadas si se está considerando una fluoroquinolona. Un ejemplo sería un estafilococo aislado de pacientes con osteomielitis.
D. Correcta. Los glicopéptidos incluyen vancomicina, un importante agente anti-estafilocócico usado cuando los agentes de primera línea son resistentes.
E. Correcta. La eritromicina se usa para infecciones de la piel en pacientes que son alérgicos a la penicilina.
F. Incorrecta. Las tetraciclinas no son agentes de primera línea.
G. Correcta. El trimethoprim-sulfamethoxazol se usa ocasionalmente para infecciones estafilocócicas más benignas.
4. A. Incorrecta.
B. Correcta. El tiempo de incubación en este escenario es solo 16 horas. La resistencia a la oxacilina en los estafilococos podría ser sutil en algunos aislamientos y con frecuencia se requiere 24 horas de incubación para detectar resistencia. Por supuesto, si la resistencia es evidente antes, puede reportarla.
5. A. Correcta. El método de suspensión directa de colonias es óptimo para detectar resistencia a oxacilina en cepas heteroresistentes.
B. Incorrecta. Si las ORSA heteroresistentes son cultivadas en caldo, la población sensible podría opacar el crecimiento de la población resistente. Esto podría comprometer la detección del aislamiento como resistente a oxacilina.
C. Correcta. El cloruro de sodio actúa como un estabilizador osmótico y permite que las poblaciones heteroresistentes expresen con más facilidad la resistencia a oxacilina. Sin este refuerzo, algunas cepas resistentes podrían no ser detectadas.
D. Incorrecta. Las pruebas de oxacilina deben ser incubadas por 24-h completas antes de reportar un resultado de sensible.
E. Correcta. Las 24-h de incubación proveen tiempo adicional para que las células resistentes a oxacilina de crecimiento lento sean detectadas como resistentes.
F. Correcta. Para microdilución en caldo esto es verdadero. Sin embargo, debido a que la difusión por disco es inadecuada para detectar resistencia a vancomicina, no hay recomendación para analizar pruebas de vancomicina de difusión por disco después de 24-h de incubación.
6. A. Correcta. Las ORSA con *mecA* típicamente son resistentes a múltiples clases de medicamentos anti-estafilocócicos, incluyendo macrólidos y lin-

- cosamidas. Estas también con frecuencia son resistentes a tetraciclinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y trimethoprim-sulfamethoxazol.
- B. Correcta. Sin embargo, este perfil ocurre con menor frecuencia que aquel que demuestra resistencia a varias clases de medicamentos. La cepas que causan infecciones adquiridas en la comunidad por lo general tienen este perfil.
- C. Incorrecta. Los estafilococos resistentes a oxacilina son siempre resistentes a la penicilina.
7. A. Incorrecta.
B. Incorrecta.
C. Correcta. El resultado de clindamicina debe ser reportado con base en los resultados de la prueba de inducción.
D. Correcta. Este es un enfoque alternativo que es preferido por muchos especialistas en enfermedades infecciosas.
8. A. Falso. Los VISA aparecen como sensibles a vancomicina en las pruebas de difusión por disco.
B. Verdadero.
C. Verdadero. Los aislamientos con perfiles de resistencia muy inusuales como VISA siempre deben guardarse para estudios posteriores.
D. Verdadero. Los resultados fronterizos de sensible son raros y deben ser confirmados.
E. Verdadero. Estudios previos han demostrado que todos los aislamientos de VISA han crecido en este medio.
F. Falso. A comienzos del 2000 menos de 50 aislamientos de VISA han sido confirmados.
9. A. Correcta.
B. Incorrecta.
C. Correcta.
D. Incorrecta.
10. A. Incorrecta.
B. Incorrecta.
C. Incorrecta.
D. Correcta. (Si este protocolo ha sido establecido en su institución.)
E. Incorrecta. Las pruebas *mecA* o PBC2a son confiables.
11. A. Falso. Solo el método de suspensión directa de colonias debe usarse para preparar inóculos para pruebas de susceptibilidad de estafilococo porque esto mejorará la detección de resistencia a oxacilina en cepas heteroresistentes.
B. Falso. La placa de tamizaje de oxacilina agar salino solo es confiable para la detección de resistencia a oxacilina en *S. aureus*.
C. Verdadero. Los estafilococos sensibles a oxacilina son considerados sensibles a cefemes; los estafilococos resistentes a oxacilina son considerados resistentes a cefemes.
D. Verdadero. A la fecha, la prueba estándar de difusión por disco para vancomicina demostró halos en el rango sensible para VISA.

CAPÍTULO 9—ENTEROCOCOS

1. A. Incorrecta.
B. Correcta. El *E. faecium* es la especie más común de ERV. Los aislamientos podrían mostrar una resistencia de alto nivel con CIM >256 µg/mL (fenotipo vanA) o de nivel moderado con CIM 16–128 µg /mL (fenotipo vanB).
C. Incorrecta.
D. Incorrecta

2. A. Correcta.
B. Incorrecta. Los aislamientos con resistencia intrínseca tipo vanC, como *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* pueden causar infecciones; sin embargo, esto ocurre infrecuentemente.
C. Correcta. Los enterococos con resistencia adquirida han sido asociados con brotes en muchas instituciones.
3. A. Incorrecta.
B. Correcta. Las pruebas de CIM de vancomicina deben realizarse en aislamientos con resultados intermedios en difusión por disco y se debe reportar los resultados de CIM. Muchos aislamientos con resultados intermedios de vancomicina en difusión por disco tendrán CIMs sensibles, de acuerdo con el documento M2 del NCCLS
4. A. Incorrecta.
B. Correcta. Los enterococos que muestran resistencia a altos niveles de gentamicina típicamente producen una enzima bifuncional, AAC (6')/APH (2^{''}), que modifica la actividad de todos los aminoglucósidos, excepto estreptomycin. Por lo tanto, es necesario probar con tobramicina y amikacina, puesto que la carencia de sinergia puede ser deducida de los resultados de gentamicina porque este aislamiento también tiene resistencia a altos niveles de estreptomycin, ningún aminoglucósido mostrará sinergismo con penicilina o ampicilina. En tales casos, las mejores opciones terapéuticas deben determinarse en forma individual para cada paciente.
5. A. Incorrecta.
B. Correcta.
C. Incorrecta. Concentraciones especiales altas del aminoglucósido son probadas para detectar la presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósido.
6. A. Incorrecta. Algunas infecciones de vías urinarias son causadas por *E. faecium*, que es típicamente resistente a ampicilina.
B. Correcta.
7. A. Incorrecta. Los enterococos intrínsecamente resistentes a vancomicina pueden crecer en la placa de tamizaje de agar vancomicina. Los aislamientos no deben reportarse como ERV. Además, otros géneros y especies que morfológicamente se parecen a los enterococos podrían crecer en este medio. Estos incluyen: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp.
B. Correcta. Estas pruebas distinguirán las especies intrínsecamente resistentes a vancomicina de aquellas con resistencia adquirida a vancomicina.

CAPÍTULO 10—STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

1. A. Correcta.
B. Incorrecta.
C. Incorrecta.
D. Correcta.
2. A. Correcta. Se ha reportado *S. pneumoniae* resistente solo a fluoroquinolonas.
B. Incorrecta. A la fecha no ha habido ningún reporte de *S. pneumoniae* que no sea sensible a vancomicina.
C. Incorrecta. Los *S. pneumoniae* resistentes a ceftriaxone no son sensibles a penicilina.
D. Incorrecta. Los *S. pneumoniae* resistentes a clindamicina también son resistentes a eritromicina. Sin embargo, el *S. pneumoniae* podría ser resistente a eritromicina pero sensible a clindamicina.
3. A. Correcta. El número de células viables en un caldo o suspensión salina de *S. pneumoniae* decrece rápidamente a temperatura ambiente.

- B. Correcta. El método de crecimiento de la preparación del inóculo NO debe ser usado para *S. pneumoniae*. Adicionalmente, es poco probable que el *S. pneumoniae* crezca satisfactoriamente en caldo Mueller-Hinton sin nutrientes adicionales.
- C. Correcta. Puesto que muchas cepas de *S. pneumoniae* no crecen adecuadamente en un medio de agar cuando se incuban en aire ambiente, se requiere incubación en CO₂ para la prueba de difusión por disco.
4. A. Incorrecta. No hay criterios de interpretación para ampicilina.
- B. Correcta. Un halo de inhibición >20 mm alrededor de un disco de oxacilina indica que el aislamiento es sensible a la penicilina. Sin embargo, si el halo de oxacilina mide <19 mm, debe realizarse una prueba de CIM de penicilina para determinar si el aislamiento es sensible, intermedio o resistente a la penicilina.
- C. Correcta. Este es el método óptimo para analizar penicilina.
- D. Incorrecta. El *S. pneumoniae* no produce beta-lactamasa. El mecanismo de resistencia para cepas que no son sensibles a la penicilina es por alteración de las proteínas ligadoras de penicilina.
5. A. Incorrecta.
- B. Incorrecta.
- C. Correcta.
- D. Incorrecta.
6. A. Incorrecta. La cefotaxima es un importante medicamento para muchos tipos de infecciones neumocócicas; por tanto los resultados de sensibilidad deben obtenerse con una prueba de CIM.
- B. Correcta.
- C. Incorrecta. Los criterios de interpretación de difusión por disco de cefotaxima para *S. pneumoniae* no han sido establecidos. El utilizar los criterios de interpretación desarrollados para bacilos gram negativos probablemente producirá resultados erróneos.
7. A. Incorrecta. La meningitis debe tratarse con dosis máximas de ceftriaxone.
- B. Correcta.
- C. Incorrecta. Detectar resistencia emergente es importante para cualquier aislamiento.
8. Falso. En los Estados Unidos, el cefepime no está aprobado por la FDA para tratar meningitis neumocócica. El documento M100 del NCCLS enumera los criterios de interpretación para cefepime y meningitis ya que los documentos del NCCLS son usados fuera de los Estados Unidos donde cefepime podría estar aprobado para la terapia de meningitis.
9. Falso. La eritromicina puede administrarse tanto por vía oral como parenteral, sin embargo, su penetración en el LCR es pobre. Entonces la eritromicina no debe usarse para tratar meningitis.
10. Falso. Debido a que la incidencia de *S. pneumoniae* con resistencia combinada intermedia y resistente en los Estados Unidos está entre 15–30%, algunos laboratorios han eliminado la prueba de tamizaje de oxacilina y ahora proceden directamente con pruebas de CIM de penicilina y ceftriaxone para evitar retrasos en el reporte de resultados. Para aislamientos de LCR de *S. pneumoniae*, se deben realizar pruebas de CIMs de cefotaxima, ceftriaxone, meropenem o penicilina tan pronto como haya suficientes colonias para realizar la prueba.
11. Verdadero. La incidencia global de resistencia de *S. pneumoniae* a gatifloxacina, levofloxacina y moxifloxacina en los Estados Unidos es menor al 3%; sin embargo, la resistencia emergente de *S. pneumoniae* a las fluoroquinolonas es una preocupación. La gatifloxacina, levofloxacina y moxifloxacina enumeradas en Grupo B Prueba/Reporte del NCCLS (estas son probadas rutinariamente y reportadas selectivamente).

12. Verdadero. El *S. pneumoniae* podría ser aislado de sitios del cuerpo diferentes al LCR en pacientes con meningitis neumocócica. Al recibir grupos de criterios de interpretación, los clínicos puede aplicar los criterios apropiados para el lugar de la infección.

CAPÍTULO 11—*STREPTOCOCCUS* SPP.

1. A. *S. mitis*.
B. *S. agalactiae*
C. *S. pyogenes*
2. Preparación del inóculo:
A. Incorrecta. Los estreptococos del grupo viridans con frecuencia tienen un crecimiento impredecible en caldo.
B. Correcta
Tiempo de incubación:
A. Incorrecta
B. Correcta
Atmósfera de incubación:
A. Correcta
B. Incorrecta
3. A. Correcta. Estos son los agentes alternativos que se usan en mujeres embarazadas para eliminar la colonización con *S. agalactiae* de la vagina antes del parto. B., C., D., y E. son Incorrectas
4. A. Incorrecta
B. Incorrecta
C. Correcta
5. A., B., y C. son Incorrectas
D. Correcta. Algunos organismos, como *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., y *Erysipelothrix rhusiopathiae*, son intrínsecamente resistentes a vancomicina y podría demostrar una morfología de las colonias similar a los estreptococos del grupo viridans. En contraste con estos géneros, estreptococos del grupo viridans no han sido reportados como resistentes a vancomicina.
6. A. Incorrecta. La prueba de difusión por disco de penicilina no es válida para estreptococos del grupo viridans. No hay criterios de interpretación de resultados de difusión por disco de penicilina disponibles para estos organismos.
B. Correcta.
C. Incorrecta. Muchos estreptococos del grupo viridans ya no son sensibles a la penicilina.

CAPÍTULO 12—*ENTEROBACTERIACEAE*

1. B. Correcta
2. A. 4
B. 1
C. 3
D. 2
3. A. Falso. La TEM-1 es una beta-lactamasa que no media la resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido.
B. Verdadero. La cefoxitina, una cefamicina, no es una cefalosporina de espectro extendido.
C. Falso. Las metalo beta-lactamasas que hidrolizan a imipenem y meropenem son poco comunes en *Enterobacteriaceae*.

- D. Falso. Las BLEEs han sido detectadas en otras especies gram negativas como *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Salmonella*; sin embargo, al momento no hay un método aprobado por el NCCLS para detectar y reportar la presencia de BLEEs en estos otros géneros.
- E. Falso. De hecho, el ácido clavulánico puede inducir la producción de algunas beta-lactamasas AmpC.
- 4. Preparación del inóculo: B. Correcta
Tiempo de incubación: A. Correcta
- 5. A, C, y D. Correcta
- 6. B, y C. Correcta
- 7. A, y C. Correcta
- 8. B. La respuesta correcta es No. Puesto que casi todos los aislamientos de las especies capaces de producir beta-lactamasa inducible pueden producir esta enzima, no es necesario realizar la prueba. Para evitar el potencial desarrollo de resistencia, los médicos deben ser educados para que usen con precaución beta-lactámicos que tienen un alto potencial de inducción o selección de mutaciones resistentes.
- 9. A, D, y H. Correctas. Recuerde, las fluoroquinolonas no deben reportarse en pacientes <12 años de edad.

CAPÍTULO 13—NO ENTEROBACTERIACEAE

- 1. Respuestas correctas:
D.
E.
F.
G.
H.
- 2. A. Correcta. Un crecimiento como este podría deberse a sobre inoculación y hace que el punto de corte sea difícil de leer.
B. Incorrecta.
- 3. A. Correcta. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana no son siempre esenciales para la atención al paciente. Antes de usar recursos significativos cuando aparecen organismos problemáticos, la situación debe discutirse con el médico del paciente.
B. Incorrecta. Este organismo no ha demostrado crecimiento satisfactorio y los resultados podrían ser imprecisos.
C. Incorrecta. Un organismo que crece pobremente por dos ocasiones es improbable que produzca resultados satisfactorios si es analizado por tercera vez. Si el médico le informa que los resultados son esenciales, debe usarse otro método como microdilución en caldo.
- 4. A. Correcta.
B. Incorrecta.
C. Incorrecta.
- 5. A. Incorrecta. A pesar que algunos laboratorios han adoptado esta práctica, no hay lineamientos estándar que documenten su precisión.
B. Incorrecta. Debido a que hay gran crecimiento de ambos tipos de colonias de *P. aeruginosa*, es necesario realizar pruebas de susceptibilidad para cada uno de ellos. Frecuentemente, los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana son diferentes, siendo por lo general la variedad mucoide más sensible.
C. Correcta.
D. Incorrecta. La *P. aeruginosa* con frecuencia contribuye a un proceso infeccioso y presenta una variedad de perfiles de susceptibilidad. Por tanto, los resultados de las pruebas de susceptibilidad son importantes para orientar la terapia.
- 6. A. Incorrecta.

- B. Incorrecta.
C. Correcta.
D. Correcta. Suponiendo que el método es aprobado por la FDA y las instrucciones adjuntas establezcan claramente que el método es aceptable para pruebas de *P. aeruginosa* mucoide y no mucoide. Asegúrese y observe cualquier restricción que sea aplicable.
7. A. Incorrecta. El imipenem es un agente aceptable para realizar pruebas y reportar contra todas las variedades de *P. aeruginosa*, siempre y cuando las cepas crezcan satisfactoriamente y que no haya restricciones para probar imipenem con el sistema de prueba.
B. Correcta.
C. Incorrecta. Tanto tobramicina como imipenem son aceptables para reportar en *P. aeruginosa*.
8. A. 1. El *A. baumannii* altamente resistente ha sido asociado con transmisión nosocomial y múltiples brotes en instituciones de salud.
B. 3. El *Acinetobacter lwoffii* generalmente es más sensible a los agentes antimicrobianos que *A. baumannii*.
C. 2. El *A. baumannii* altamente resistente es universal pero cepas de tipo salvaje resistentes tan solo a unos pocos agentes de espectro restringido a veces se encuentran entre las muestras de pacientes.
9. A. Correcta. El *A. baumannii* es único y algunas cepas son inhibidas por el componente de sulbactam. El sulbactam típicamente actúa como un inhibidor de beta-lactamasa y tiene poca, si acaso, actividad antibacteriana contra otras especies.
B. Correcta. La polimixina B ha sido usada para tratar infecciones causadas por *A. baumannii* resistente a virtualmente todas las demás clases de agentes antimicrobianos. Las polimixinas no son prescritas con frecuencia por su toxicidad. Debido a que la prueba de difusión por disco es poco confiable para este medicamento, la prueba se debe realizar con un método de CIM. No hay criterios de interpretación del NCCLS para Polimixina B; sin embargo, un estudio sugiere que una CIM >4 µg/mL indica resistencia. (Gales et al. 2001. J. Clin. Microbiol. 39:183.)
C. Incorrecta. La vancomicina es activa solo contra bacterias gram positivas y no tiene actividad contra *Acinetobacter* spp.
(El laboratorio analizó ampicilina-sulbactam y el organismo fue sensible. Se prescribió ampicilina-sulbactam y la condición del paciente desapreció. El paciente fue aislado en un esfuerzo para contener la propagación de este organismo altamente resistente.)
10. A. Incorrecta. Puesto que la muestra de expectoración y solo unas pocas colonias están presentes junto a flora normal, el *S. maltophilia* probablemente representa colonización. Consecuentemente, no se debe hacer la prueba en forma rutinaria.
B. Correcta.
11. A. Correcta.
B. Incorrecta. La mayoría de cepas crecerán bien en paneles de rutina de CIM de microdilución en caldo que contengan caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes.
C. Correcta. El trimethoprim-sulfamethoxazol es el medicamento de elección para *S. maltophilia* y hay poca resistencia a este agente.
12. A. Incorrecta. A pesar de la actividad del imipenem contra la mayoría de bacterias gram negativas no es activo contra *S. maltophilia*. Si se obtuvo un resultado de sensible para *S. maltophilia*, es probable que se deba a un problema técnico ya que virtualmente todos los *S. maltophilia* son resistentes a imipenem.
B. Correcta.
13. A. Incorrecta. La ticarcillina sola no ha sido un medicamento efectivo contra *S. maltophilia* y el NCCLS no recomienda probar y reportar este agente.

- B. Correcta.
 - C. Correcta. Si un paciente tiene alergias a la sulfa este resultado no ayudará al médico. En todo caso, será importante para el propósito de controlar infecciones notar si el aislamiento tiene un perfil típico de sensibilidad (eje., sensible a trimethoprim-sulfamethoxazol).
 - D. Correcta.
 - E. Correcta. Sin embargo, estudios han demostrado que cepas podrían ser resistentes a tetraciclina, pero sensibles a minociclina. Su médico podría querer resultados para minociclina. Puesto que no puede realizar una prueba de difusión por disco en *S. maltophilia* y puesto que la minociclina probablemente no está en sus paneles de rutina, podría ser necesario enviar el aislamiento a un laboratorio de referencia para obtener resultados de minociclina.
14. A. Correcta.
- B. Correcta. Sin embargo, el *S. maltophilia* ha demostrado un rápido desarrollo de resistencia a las fluoroquinolonas. Algunas nuevas fluoroquinolonas (eje., levofloxacin) podrían ser más activas que la ciprofloxacina contra *S. maltophilia*.
 - C. Incorrecta. El *S. maltophilia* típicamente es resistente a meropenem así como a imipenem.

CAPÍTULO 14—HAEMOPHILUS SPP.

1. A. Incorrecta
 - B. Correcta. Cuando se aísla *H. influenzae* de pacientes con infecciones que amenazan la vida (eje. meningitis, bacteriemia y epiglotitis) se deben realizar pruebas de sensibilidad de difusión por disco o CIM.
2. A. Correcta si el aislamiento es beta-lactamasa negativo. Por definición, aislamientos beta-lactamasa positivos son resistentes a ampicilina.
 - B. Correcta. Se debe probar una cefalosporina de espectro extendido (cefotaxima o ceftriaxone) ya sea con difusión por disco o un método de CIM. Al momento, los reportes de resistencia a cefalosporina de espectro extendido en *H. influenzae* son no substanciados.
 - C. Correcta
 - D. Correcta si el meropenem está en el vademécum de su hospital.
3. A. Incorrecta. En el documento M100 del NCCLS, Cuadro 1A, tanto la ampicilina como el trimethoprim-sulfamethoxazol están enumerados en el Grupo A (Prueba y Reporte Primario).
 - B. Correcta.
 - C. Incorrecta
4. A. Correcta. A pesar que raros aislamientos podrían ser BLNRA, que solo podrían ser detectados con pruebas convencionales de difusión por disco o CIM.
 - B. Correcta. La HTM es usada exclusivamente para *Haemophilus* spp. y la mayoría de laboratorios tiene un bajo volumen de aislamientos de *Haemophilus* spp. que amerita análisis. Los costos típicamente son altos para un bajo volumen de pruebas.
 - C. Correcta
 - D. Correcta
5. A. Incorrecta
 - B. Correcta. Algunas cepas son resistentes a ampicilina debido a proteínas de ligazón a la penicilina alteradas.
 - C. Incorrecta

CAPÍTULO 15—NEISSERIA/MORAXELLA

1. A. Correcta. Las infecciones genitales no complicadas causadas por *N. gonorrhoeae* son tratadas empíricamente. La resistencia a los medicamentos de elección, como ceftriaxone, cefixime o una fluoroquinolona, es generalmente baja en los Estados Unidos.
B. Incorrecta. Las pruebas de beta-lactamasa son usadas principalmente para probar la resistencia a la penicilina. La penicilina ya no es recomendada para tratar infecciones causadas por *N. gonorrhoeae* en los Estados Unidos porque este organismo tiene una alta incidencia de resistencia.
C. Incorrecta. El NCCLS publicó métodos estándar de *N. gonorrhoeae* para pruebas tanto de difusión por disco como dilución en agar de CIM.
2. A. Correcta.
B. Incorrecta. Como para otros organismos que crecen impredeciblemente en caldo, no debe usarse un método de crecimiento.
C. Incorrecta. Como para otros organismos que crecen impredeciblemente en caldo, no debe usarse un método de crecimiento.
3. A. Incorrecta. Puesto que generalmente los resultados de beta-lactamasa no son utilizados para la atención al paciente, muchos departamentos de salud han informado a los laboratorios clínicos que las pruebas de rutina de beta-lactamasa no son necesarias. Sin embargo, algunos departamentos de salud podrían requerir esta información para propósitos epidemiológicos.
B. Correcta.
4. A. Incorrecta.
B. Incorrecta.
C. Correcta.
5. A. Incorrecta. Primero, muchos aislamientos de *N. gonorrhoeae* son resistentes a la penicilina. Segundo, la penicilina, en la mayoría de países, no es el medicamento de elección para tratar gonorrea.
B. Correcta.
C. Correcta.
6. A, B y C son Correctas.
7. A. Correcta.
B. Incorrecta.
C. Incorrecta. La *N. meningitidis* crece bien en CAMBH con 5% de sangre lisada de caballo con incubación en CO₂.
D. Correcta.
8. A. Incorrecta.
B. Incorrecta. Las infecciones respiratorias y otras causadas por *M. catarrhalis* podrían requerir terapia antimicrobiana.
C. Correcta.

CAPÍTULO 16—ANAEROBIOS

1. A. Incorrecta. Existe resistencia significativa entre muchas especies anaeróbicas comúnmente encontradas y las tasas de resistencia están aumentando.
B. Correcta.
C. Correcta.
D. Incorrecta. Los miembros del grupo *B. fragilis* (los anaerobios más comunes encontrados en muestras clínicas) y otras especies anaeróbicas son frecuentemente resistentes a la penicilina. La penicilina usualmente no es el medicamento de primera línea para tratar infecciones anaeróbicas a menos que se conozca que el agente etiológico es sensible al agente.

2.
 - A. Incorrecta. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana no deben realizarse en aislamientos de muestras de líquido peritoneal que contengan flora mixta anaeróbica y aeróbica. Sin embargo, podría haber una ocasión (eje., absceso cerebral) cuando aislamientos de cultivos mixtos justifiquen una prueba.
 - B. Incorrecta. Probablemente representan contaminación de la piel.
 - C. Correcta.
 - D. Correcta.
3.
 - A. Incorrecta.
 - B. Correcta. Los bacilos anaeróbicos gram negativos son típicamente sensibles a metronidazol. El resultado de resistente sugiere que la prueba podría estar contaminada con un anaerobio aero-tolerante (*Propionibacterium* spp.) o un aerobio.
4.
 - A. Correcta.
 - B. Correcta.
 - C. Correcta. Si la bacteriemia anaeróbica no es tratada apropiadamente, la tasa de mortalidad es cercana al 60%. La tasa de mortalidad disminuye a aproximadamente 15% cuando la bacteriemia es tratada con agentes antimicrobianos apropiados.
5.
 - A. Incorrecta.
 - B. Incorrecta. Generalmente esto no sería costo-efectivo puesto que el número de pruebas de CC requeridas por tanda sería grande. Además, es difícil mantener la destreza en una prueba en particular si esta se realiza infrecuentemente.
 - C. Correcta.
6.
 - A. Correcta. A pesar que esto no es ideal porque las poblaciones de pacientes pueden diferir y podrían encontrarse diferentes tipos de anaerobios, puede proveer información útil para terapia empírica.
 - B. Correcta. El NCCLS sugiere esto como una estrategia.
 - C. Correcta. Hay publicaciones que describen la vigilancia para la resistencia emergente en anaerobios, particularmente para *B. fragilis*. Estos datos son útiles pero no ideales porque los perfiles de sensibilidad podrían variar en diferentes áreas geográficas y en pacientes individuales.
7.
 - A. Incorrecta.
 - B. Incorrecta.
 - C. Correcta. Empero el *B. fragilis* está presente con otro organismo es probable que sea significativo en esta situación. Debido a sus variados perfiles de sensibilidad, la prueba está indicada. El *Peptostreptococcus* spp. tiene patrones predecibles de sensibilidad y es sensible a medicamentos que serían prescritos para *B. fragilis*. Frecuentemente, cuando se escoge la terapia antimicrobiana para cubrir el *B. fragilis*, otros anaerobios que podrían estar contribuyendo a la infección también son inhibidos.

Apéndice

REGLAS BASICAS DE BIOSEGURIDAD

Se deben tomar las siguientes precauciones cuando se hacen las pruebas de susceptibilidad:

1. Siga las prácticas de Bio-Seguridad Nivel 2 (BSL2).* No se requiere usar guantes y mascarilla cuando se trabaja con bacterias BSL2 en cultivo puro.
2. Use una bata de laboratorio abotonada.
3. Desinfecte el área de trabajo antes de trabajar, si se derrama algún material, y al final de la jornada de trabajo.
4. Evite crear aerosoles. Para la prueba de difusión por discos, remueve el exceso de inóculo del hisopo antes de inocular el agar. Si se requiere usar el vortex, use tubos con tapas de rosca y sello.
5. Use el envase para agudos cuando disponga de pipetas, lupas para inocular, hisopos, palitos de madera, hisopos o cualquier material agudo.
6. Todo material contaminado debe ser descartado en envases para material biológico peligroso.

*A ningún costo, podrá encontrar en la “Web,” en español y en inglés, un manual con información esencial sobre las prácticas de bioseguridad BSL-2.

“Bioseguridad en Laboratorios Biomédicos y de Microbiología (BMBL);, 4ª edición.” <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty.htm>

El manual se puede comprar enviando su pedido a la siguiente dirección:

US Government Printing Office

Washington, DC 20202

Stock #: 017-040-00547-4

MÉTODO DE PREPARACIÓN DEL 0,5 STANDARD DE MCFARLAND

Reactivos

- 1% Cloruro de Bario (BaCl_2) anhidrido
- 1% Ácido sulfúrico (H_2SO_4) puro y frío

Método de Preparación

1. Añadir 0,5 mL de 1% BaCl_2 a 99,5 mL de 1% de H_2SO_4 .
2. Revuelva para mantener en suspensión.
3. Mezclar completamente ante de proceder al siguiente paso.
4. Distribuya 5 mL de la solución de McFarland en tubos de diámetros similares. Se sugiere usar los mismos tubos que se utilizan rutinariamente para ajustar la densidad de las suspensiones antes de la inoculación.
5. Cuando estos estándares están en suspensión completa, la turbidez equivale a un cultivo que contiene $1,5 \times 10^8$ células.
6. Los tubos que contienen la solución de 0.5 McFarland se deben guardar en un lugar oscuro, a temperatura ambiente.
7. Consulte el documento M2 de la NCCLS para mas detalles y también para el procedimiento para el control de calidad.

...De NCCLS M100-S14 (M7)

La siguiente tabla refleja los medicamentos listados para ser probados contra los organismos respectivos en las Tablas 2A-2J en M100 y da algunos ejemplos a considerar para protocolos de verificación en dada institución. La lista incluye Fenotipos que 1) nunca han sido documentados, 2) no son comunes, y/o 3) representan resultado que fácilmente pueden ocurrir de errores técnicos y que pueden tener consecuencias clínicas significativas.

Tabla 8. Sugerencias para Verificación de Resultados de Prueba de Susceptibilidad Antimicrobial y Confirmación de Identificación de Organismos

Organismo o Grupo	Categoría I ^a Fenotipos que no han sido reportados, no son comunes y/o resultan de errores técnicos	Categoría II ^b Fenotipos que pueden ser poco comunes en dada institución y/o resultan de errores técnicos
Organismos gram-negativos		
<i>Enterobacteriaceae</i> (cualquiera)	carbapeneme-I o R	amikacina-R flouroquinolona-R
<i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter</i> spp. <i>Serratia marcescens</i>	ampicilina, cefazolina o cefatolina-S	
<i>Escherichia coli</i>		BLEE confirmado positivo
<i>Klebsiella</i> spp.	ampicilina-S	BLEE confirmado positivo
<i>Proteus vulgaris</i> <i>Providencia</i> spp.	ampicilina-S	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		gentamicina concurrente y tobramicina y amikacina-R
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	carbapeneme-S	trimethoprim-sulfamethoxazole-R
<i>Haemophilus influenzae</i>	aztreonam-NS carbapeneme-S cefalosporina 3era generación-NS ^c flouroquinolona-NS	ampicilina-R y beta-lactamasa negativa amoxicila-ácido clavulánico-R
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	cefalosporina 3era generación-R	flouroquinolona-R
Cualquier organismo	Resistente a todos los agentes probados rutinariamente.	
Organismos gram-positivos		
<i>Enterococcus</i> spp		vancomicina-R
<i>Enterococcus faecalis</i>	ampicilina o penicilina-R quinupristina-dalfopristina-S linezolid-R	aminoglucósido-R de alto-nivel (particularmente si aislado de área de cuerpo estéril)

Organismos gram-positivos

<i>Enterococcus faecium</i>	linezolida-R	aminoglucósido-R de alto-nivel (particularmente si aislado de área de cuerpo estéril)
<i>Staphylococcus aureus</i>	linezolida-NS quinupristina-dalfopristina-I o R vancomicina-I o R	oxacilina-R
<i>Staphylococcus</i> , coagulosa-negativa	linezolida-NS vancomicina-I o R	penicilina-R cefalosporina-R 3era- generación
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	fluoroquinolona-R linezolida ^c -NS vancomicina ^c -NS	
<i>Streptococcus</i> grupo beta	ampicilina o penicilina ^c -NS cefalosporina 3era-generación-NS linezolida-NS vancomicina ^c -NS	
<i>Streptococcus</i> grupo viridian	linezolida-NS vancomicina-NS	penicilina-I o -R
Cualquier organismo	Resistente a todos los agentes probados rutinariamente.	

^aCategoría I

Cuando los resultados listados en esta categoría son observados en aislamientos individuales de pacientes, deben ser verificados por uno o más de los siguientes:

1. Asegurando que los resultados inusuales no son debido a errores de transcripción, contaminación o uso de un panel, cultivo o medio defectuoso.
2. Checando reportes anteriores del paciente para determinar si el aislamiento fue encontrado y verificado anteriormente.
3. Confirmando la identificación de aislamientos.
4. Repitiendo la prueba de susceptibilidad para confirmar los resultados. Algunas veces ayuda el usar métodos de prueba alternativos para la prueba a repetir.
5. Para aislamientos que muestran resultados otros que susceptibilidad para esos agentes antimicrobianos para los que solo son proveídos criterios interpretativos de susceptibilidad en las Tablas 2A-2J (listados con "NS" arriba) y para estafilococos con vancomicina intermedia o resultados resistentes; 1) confirmar la identificación del organismo; 2) confirmar el resultado de la prueba de susceptibilidad antimicrobial; 3) guardar el aislamiento; y 4) mandar el aislamiento a un laboratorio de referencia que lo probará por medio de un método de dilución de referencia NCCLS.

^bCategoría II

Cuando los resultados listados en esta categoría son observados en aislamientos individuales de pacientes, los pasos de verificación como se resalta en la Categoría I, deben ser considerados si la resistencia es poco común en dada institución.

^cPara estas combinaciones de agentes/organismos antimicrobiales la resistencia no ha sido documentada a la fecha.

Prueba de Susceptibilidad por Difusión por discos Guía para la Resolución de Problemas

RESULTADOS ABERRANTES	CAUSAS PROBABLES	ACCION CORRECTIVA (documentar todos los errores)	EFECTO EN LOS REPORTES DIARIOS
El halo (zona) de tetraciclina es muy grande y el de clindamicina muy pequeño en las cepas control de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	pH del medio demasiado bajo	Ajustar el pH del medio a 7,2–7,4 antes de verter el medio	NO REPORTAR los resultados hasta que se haya corregido el problema y que un lote nuevo del medio produzca resultados satisfactorios con las cepas control
El halo de tetraciclina es muy pequeño y el de clindamicina muy grande en las cepas control de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	pH del medio demasiado alto	Use un lote nuevo Los medios comerciales no deben tener problemas de pH	
El halo de los aminoglicosidos es muy pequeño con la cepa control de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	La concentración en Ca ⁺⁺ y/o Mg ⁺⁺ es muy alta en el medio	(La incubación en CO ₂ puede alterar el pH de la superficie del agar)	NO REPORTAR los resultados de aminoglicosidos en <i>P. aeruginosa</i> y <i>Acinetobacter</i> hasta que los halos correspondan a los estándares del control de calidad
Los halos en los aminoglicosidos con la cepa control de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> es muy grande	La concentración en Ca ⁺⁺ y/o Mg ⁺⁺ es muy baja en el medio	Adquirir un nuevo lote de agar que cumpla con los requisitos del control de calidad	
Los halos son universalmente muy grandes en las placas (platos) control	Bajo inóculo	Ajustar el inóculo a la turbidez de 0,5 McFarland	No reportar hasta que el control de calidad esté dentro de los rangos (límites) aceptables
	El nivel nutritivo del medio es muy bajo	Usar solamente el agar Mueller-Hinton	NO REPORTAR hasta que se use agar Mueller-Hinton
	Organismos de crecimiento lento (no se evidencia en los controles)	Usar el procedimiento de la concentración mínima inhibitoria (CIM) solamente	NO REPORTAR los resultados por difusión en discos con ningún organismo de crecimiento lento
Los halos son universalmente muy pequeños en las placas control	Medio de profundidad inadecuada (muy delgado)	Usar un medio con profundidad de 4 mm	NO UTILIZAR este lote para las pruebas
	Inóculo demasiado concentrado	Ajustar el inóculo a la turbidez de 0,5 McFarland	NO REPORTAR hasta que se use agar Mueller-Hinton
Los resultados para un solo disco son más altos o más bajos que el nivel especificado para las cepas control	Medio de profundidad inadecuada (muy grueso)	Usar un medio con profundidad de 4 mm	NO UTILIZAR este lote del medio para las pruebas
	Error en la lectura de la zona borrosa.	Note el error. Repita la lectura y pida una segunda opinión.	Reportar los resultados con los otros discos siguiendo el protocolo establecido.
	Errores de transcripción.	Estadísticamente, se puede esperar ocasionalmente algún resultado fuera de los rangos.	Repetir la prueba con el antibiótico fuera de rango con la cepa control y las cepas de los pacientes antes de reportar las pruebas actuales.
	Disco malo. (los discos malos tienen tendencia a deteriorarse gradualmente)	Los valores suelen caer dentro de los rangos al repetir la prueba.	
	El disco no se adhirió firmemente a la superficie del agar.		

RESULTADOS ABERRANTES	CAUSAS PROBABLES	ACCIÓN CORRECTIVA (documentar todos los errores)	EFFECTO EN LOS REPORTES DIARIOS
Colonias dentro de la zona de inhibición	Cultivo mixto o contaminado	Aislar, identificar y repetir la prueba con un cultivo puro solamente	NO REPORTAR los resultados de esta placa
	Mutantes resistentes dentro de la zona de inhibición	Hacer una tinción de Gram o alguna otra prueba para reconocer el contaminante. Repetir la prueba	Medir las zonas libres de colonias e interpretar
Halos muy grandes con los anaerobios		NO USAR el procedimiento de difusión por discos para probar anaerobios	
La cepa de <i>S. aureus</i> de un paciente es resistente a oxacilina un día y sensible el otro día	Pueden ser dos organismos diferentes	Controlar la temperatura de la prueba. La prueba se debe hacer a 35°C y la placa debe ser incubada por 24 horas.	Reportar los resultados obtenidos después de 24 horas completas de incubación a temperatura de 35°C
	El cambio de temperatura de 37°C a 35°C puede alterar el tamaño del halo en este caso.	Hacer la prueba de disco con cefoxitina, si no fue hecha antes (referencia al documento NCCLS).	
Zonas de inhibición solapadas	Discos colocados muy cerca uno de cada uno	No utilizar más de 12 discos en las placas 150 mm y 4 o 5 discos en placas de 100 mm. Colocar los discos no más de 15 mm del borde de la placa.	Repetir la prueba
Halos indistintos con colonias individuales evidentes en la placa de agar	Inoculación inapropiada, Inóculo inadecuado.	Usar el inóculo apropiadamente ajustado y repetir la prueba	Repetir la prueba antes de reportar
Fenómeno de “Zona”	Velo de crecimiento “swarming” de <i>Proteus</i>	Leer la zona ancha y clara. Pasar en alto el “swarming” dentro de la zona	Reportar los resultados del halo bien definido. Ignore el “swarming”
	Un borde borroso de las zonas alrededor de los discos de penicilina o ampicilina usualmente ocurre con cepas de <i>S. aureus</i> que son beta-lactamasa negativa.	Medir el punto donde se nota la demarcación obvia entre el crecimiento y la falta de crecimiento. Procure no hacer esfuerzo para ver las colonias más pequeñas.	Reportar los halos como se indicó anteriormente.
Sulfonamides	Ignore el crecimiento escaso en la zona de inhibición. Medir el halo donde haya 80% de reducción en el crecimiento.	Reportar los halos como se indicó anteriormente.	
Beta-lactamase positiva <i>Haemophilus influenzae</i> beta-lactamasa positiva con penicilina ó ampicilina	Use el halo interior	Notificar al médico si el diagnóstico es meningitis.	
Halos indistintos con sulfamethozzone con o sin trimethoprim o con trimetoprim solamente	El exceso de tiamina o timidina en el medio permite que ciertos organismos adopten vías metabólicas alternas a los blancos metabólicos usuales de estos antibióticos	Use placas comerciales libres de timidina. Medir el halo donde haya 80% de reducción en el crecimiento.	Reportar como de costumbre si confía que los resultados son buenos

NOTA: Para más información, refiérase a el Apéndice de este Manual: la Tabla 8 “Sugerencias para la Verificación de los Resultados de la Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana y Confirmación de la Identificación de los Organismos”: del documento M100 de la NCCLS.

Glosario

A

Antibiograma

Perfil de sensibilidad de una bacteria a un conjunto de agentes antimicrobianos

Antibiótico

Cualquier agente antimicrobiano producido por un microorganismo. Este inhibe el metabolismo y/o el crecimiento de un microorganismo y puede matarlo.

Por ejemplo la penicilina del *Penicillium notatum*. En la naturaleza existe un gran número de antibióticos, pero solamente unos pocos son seguros para uso humano

Antimicrobiano

Cualquier sustancia natural, semi-sintética o de origen sintético que inhibe el metabolismo y/o el crecimiento de un microorganismo y puede matarlo.

B

Bactericida

Mata la bacteria

Bacteriostático

Inhibe el crecimiento de la bacteria sin matarla

Beta lactamasas

Enzimas producidas por microorganismos que destruyen la actividad de los agentes beta-lactámicos a través de la hidrólisis de la porción del anillo beta-lactámico. Hay muchos tipos de beta lactamasas cada una de las cuales tiene actividad específica contra los agentes beta-lactámicos

Prueba de beta-lactamasa

Únicamente utilizada en los laboratorios clínicos para detectar beta-lactamasa en *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., y algunas bacterias anaerobias

Prueba de beta lactamasa positiva

Indica que la bacteria es resistente a las penicilinas que son beta lactamasas lábiles incluyendo ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, mezlocilina, piperacilina y ticarcilina

Prueba de beta lactamasa negativa

Cuando un *H. influenzae*, *M. catarrhalis* y *Staphylococcus* spp. dan una prueba negativa para beta-lactamasas sugiere que los organismos mencionados son sensibles a las beta lactamasa lábiles señaladas arriba. Pero para *N. gonorrhoeae*, *Enterococcus* spp., y bacterias anaeróbicas, pueden disponer de un mecanismo de resistencia no mediado por una beta lactamasa y conferir re-

sistencia a las penicilinas lábiles a la beta-lactamasa. Esta resistencia es detectada con un método convencional de prueba de difusión por disco o una CIM

Beta lactamasas de espectros ampliados (BLEEs o ESBLs en inglés)

Las beta lactamasas de espectros extendidos ampliado son enzimas producidas por algunas *E. coli* y *Klebsiella spp* (algunas veces otras *Enterobacteriaceae*), inactivan las penicilinas, las cefalosporinas de espectro extendido y el aztreonam

BLNAR

Beta-lactamasa negativa, resistente a ampicilina.

BORSA

S. aureus con resistencia “borderline” a oxacilina.

C

CIM

Ver Concentración inhibitoria mínima

CIM por microdilución

Esta prueba se realiza en una pequeña bandeja de plástico con 96 pocillos (12 columnas de 8 pocillos). Cada pocillo contiene un volumen estándar (ejemplo 0.1 ml) de soluciones de antimicrobianos preparados en diluciones log 2. Una batería de agentes antimicrobianos (ejemplo 8 a 12) se incluyen en cada bandeja que es inoculada con el aislamiento del paciente

Citocentrífuga

Es un tipo de centrífuga que permite colocar la muestra centrifugada en forma de película sobre un portaobjetos

Colonizadores

Microorganismos presentes en un huésped que no están causando un proceso infeccioso

Concentración inhibitoria mínima

Es la concentración más baja de un agente antimicrobiano requerida para inhibir el crecimiento de un microorganismo

C & S

Cultivo y sensibilidad (susceptibilidad)

E

ERV

Enterococcus resistente a vancomicina

Estándar de McFarland

El Estándar 0,5 de McFarland corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Es usado cuando se ajustan suspensiones del inóculo para pruebas de susceptibilidad.

E-Test (Pueba-E o Epsilométrical)

Un tipo de prueba de susceptibilidad antimicrobiana comercial en la que tiras de plástico impregnadas de concentraciones gradientes de antimicrobianos son colocadas en la superficie de un agar que previamente ha sido inoculado con la bacteria del paciente. Luego de incubar toda la noche, la actividad antimicrobiana se puede observar como una elipse de inhibición de crecimiento alrededor de la tira. La superficie de la tira E-test tiene una escala numérica que permite ver el valor que el aislado obtuvo en el punto donde el elipse cruza con la escala.

F

Fastidiosos

Se refiere a los microorganismos que requieren de nutrientes o condiciones ambientales especiales para su crecimiento.

Flora normal

Microorganismos normalmente presentes en un sitio específico del cuerpo humano (ejemplo garganta) que generalmente son beneficiosos para el huésped

G

GC

Gonococos (*Neisseria gonorrhoeae*).

GISA

Staphylococcus aureus intermedio a glicopéptidos incluyendo vancomicina y teicoplanina (ver también VISA).

I

In vitro

En el laboratorio

In vivo

En el cuerpo del paciente

K

Kirby-Bauer

Ver prueba de difusión por disco

L

Limite

Ver punto de corte

M

Ver Estándar de McFarland

MicroScan

Es un equipo comercial automatizado utilizado rutinariamente en muchos laboratorios de microbiología para la identificación y pruebas de sensibilidad para bacterias de crecimiento rápido

MLS

La resistencia a los macrólidos (eje. eritromicina) y las lincosamidas (eje. clindamicina).

MRSA

S. aureus resistente a meticilina. Es un sinónimo de *S. aureus* resistente a oxacilina (oxacilina es utilizada para la prueba *in vitro* debido a que es un mejor agente para detectar la resistencia de las penicilinas estables a la penicilinasas

N

NCCLS

El Instituto para la normatización de Laboratorios Clínicos anteriormente conocido como El Comité Nacional para la Normatización de Laboratorios Clínicos (NCCLS) es una organización sin fines de lucro, con miembros representando a varias disciplinas. Es una organización educativa que enseña a través de foros el desarrollo, promoción y uso de normas nacionales e internacionales relacionadas con las pruebas de susceptibilidad, su uso apropiado y la interpretación de los resultados.

NCCLS Documento para las pruebas de susceptibilidad

EL NCCLS elabora documentos dirigidos a varios tópicos de la ciencia del laboratorio clínico, tales como el análisis de glucosa en suero y protección de los trabajadores de los laboratorios de los patógenos transmitidos por sangre. Tanto los documentos para la realización de las pruebas de susceptibilidad y el reporte correspondiente, son desarrollados por un subcomité que involucra expertos en enfermedades infecciosas, farmacia y prácticas de laboratorios clínicos.

NGPP

N. gonorrhoeae productora de penicilinas.

O

ORSA

Ver MRSA

P

PBPs

Las siglas en inglés para PLPs. Ver PLPs

PLPs

Las Proteínas Ligaduras de Penicilina, son un grupo de enzimas de membrana que son responsables de las uniones cruzadas del peptidoglicano en la pared celular. Su sitios de acción se localizan en el espacio periplásmico

Prueba de tamizaje en agar para oxacilina

Se leva a cabo en un agar Mueller Hinton que contenga 6 ug/mL de oxacilina más 4% de cloruro de sodio. Este medio es utilizado para tamizaje de los *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina

Prueba de tamizaje para resistencia a vancomicina

Esta prueba se lleva a cabo en un agar cerebro corazón que contienen 6 ug/ml de vancomicina. Se utiliza para el tamizaje de la resistencia del enterococos a vancomicina

Prueba de difusión (Kirby-Bauer)

Es un tipo de prueba de sensibilidad en la cual se utilizan discos de papel filtro impregnados con varios agentes antimicrobianos y colocados sobre la superficie de un caja o placa Petri con agar, previamente inoculada con la bacteria del paciente. Después de una noche de incubación, las zonas de inhibición alrededor del disco son medidas e interpretadas como sensible, intermedio o resistente (basada en criterios pre-establecidos)

PSA

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

Punto de corte (limite)

Asociado con el “criterio interpretativo” de las tablas del NCCLS de los valores en la CIM y pruebas de difusión para distinguir entre sensible, intermedio y resistente

R**Recuento de colonias**

Número de colonias que crecen en un medio de cultivo luego de colocar el espécimen en el agar. Cada colonia se forma a partir de una única bacteria a menos que ellas se desarrollen en grupos o cadenas (por ejemplo estafilococos o estreptococos)

El recuento de colonias a menudo se utiliza para determinar la importancia de la cantidad de microorganismos en ciertos tipos de muestras como en el caso de la orina

Reporte jerárquico (ver también reporte selectivo)

Interpretación de Intermedio (indeterminado) en relación con las pruebas de susceptibilidad implica que la droga puede ser útil de acuerdo con la capacidad de la droga de concentrarse fisiológicamente en el sitio anatómico infectado (ejemplo quinolonas y beta-lactámicos en orina) o cuando es posible utilizar una dosis más alta (ejemplo beta lactámicos)

Reporte selectivo

Es reportar la prueba de susceptibilidad basada en la identificación del organismo, su perfil completo de susceptibilidad y el sitio que presenta infección en el paciente. Agentes antimicrobianos secundarios (amplio espectro, drogas más costosas o más tóxicas) son reportados únicamente si ellos ofrecen ventajas clínicas o si el organismo es resistente a los agentes primarios

Resistente

Es un término terapéutico, resistencia significa que un microorganismo no es inhibido por una concentración del agente antimicrobiano que puede alcanzar en un fluido del cuerpo luego de una dosis estándar terapéutica

RCP

Reacción en cadena de la polimerasa. Esta reacción permite la detección e identificación de los microorganismos mediante la amplificación de secuencias de ADN, únicas en cada microorganismo

S**Susceptible (sensible)**

En términos terapéuticos sensible significa que un microorganismo es inhibido por una concentración del agente antimicrobiano que puede alcanzar en un fluido corporal luego de una dosis terapéutica

T**Tamizaje de sinergia**

Esta prueba detecta la resistencia de alto nivel de los aminoglucósidos (a gentamicina y/o estreptomycin) en enterococos y determina si los aminoglucósidos actuarán sinérgicamente en combinación con un agente activo contra la pared celular

U**UFC (unidad formadora de colonias)**

Una unidad formadora de colonia se asume que se forma a partir de una bacteria.
Ver recuento de colonias arriba

V**VISA**

S. aureus con resistencia intermedia a vancomicina (ver también GISA)

Vitek

Vitek Equipo automatizado, ampliamente utilizado en muchos laboratorios de microbiología para la identificación y pruebas de sensibilidad de bacterias de crecimiento rápido.

VRSA

S. aureus con resistencia completa a vancomicina.

Índice

A

- Acción Correctiva, 74–75
 - definición, 65
 - ejercicios, 78–82
 - lista de control, 76
 - prueba para cefazolina, 75
 - responsabilidades del fabricante, 79
 - responsabilidades del usuario, 79
 - resultados de pacientes, 78
- Acetiltransferasas de aminoglucósidos (AAC), 121
- Ácido clavulánico, 19, 158, 166
- Ácido fólico, 8
- Ácido nalidíxico, 167
- Ácido para amino benzoico (PABA), 8
- Ácido teicoicos, 5
- Acinetobacter, 173, 175
- Acinetobacter baumannii, 85, 174–75, 176
- Actinomyces, 203
- Actividad in vitro, 35
- Adeniltransferasas de aminoglucósido (AAD), 121
- Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), 94
- ADN girasa, 9, 172
- Agar bilis esculina azida (BEA), 130–31
- Agar Brucella, 207
- Agar HTM, 187
- Agar infusión de cerebro corazón (BHIA), 123–24
- Agar Mueller-Hinton (MHA), 42, 187
- Agentes antimicrobianos, 5–6
 - discos, 43–44
 - documentos sobre las pruebas de susceptibilidad, 25–26
 - modos de acción, 6–8
 - oral, 34–35
 - relacionamiento de, 83
 - resistencia a, 8–9
 - resistencia adquirida, 9–10
 - resistencia intrínseca, 9–10
- Agentes bactericidas, 5–6

- Agentes bacteriostáticos, 5–6
- Agentes de bioterrorismo, 30
- Alto nivel de resistencia a aminoglucósidos (HLAR), 121, 124–26
- Amikacina, 84, 172, 174
- Anaerobios, 203–11
- Antibiogramas típicos, 83
- Antibióticos, eflujo de, 9. *Vee antibióticos específicos*
- Aseguramiento de calidad, 65
- Aseguramiento de calidad/control de calidad (AC/CC), 65–91
- AutoSCAN-4, 98
- AutoSCAN-WA, 98

B

- Bacillus anthracis, 30
- Bacterias gram-negativas
 - actividad de los beta lactámicos en, 6, 7
 - beta-lactamasas, 15
 - bombas de eflujo, 9
 - cepas de CC ATCC, 69
 - estructura de, 3–4
 - mecanismos de resistencia, 8–9
 - verificación de sistema, 96
- Bacterias gram-positivas
 - actividad de los beta lactámicos en, 7
 - beta-lactamasas, 15
 - cepas de CC ATCC, 69
 - estructura de, 3–4
 - mecanismos de resistencia, 8–9
 - verificación de sistema, 96
- Bacterias no fastidiosas, 28, 30–31
- Bacteriemia, 183
- Bacteriófagos, 10
- Bacterias fastidiosas, 41
- Bacteroides, 203
- Bacteroides distasonis, 203
- Bacteroides fragiles, 203
 - ATCC 25285, 208
 - caso de estudio, 204–5, 208–9
 - interpretación de resultados, 207–8

- pruebas, 206–7
 Bacteroides thetaiotaomicron, 203, 208
 Beta-lactamasa negativa, cepas resistente a
 ampicilina (BLNAR), 184, 188
 Beta-lactamasas
 amplio-espectro, 17–18
 BRO-1, 198
 BRO-2, 198
 características, 166
 caso de estudio, 20–21
 clasificación, 16–19
 constitutiva, 17
 descripción general, 15–16
 Enterobacteriaceae, 159
 enzimas ampC, 158
 espectro extendido (BLEE), 18,
 157–58, 166
 función, 8
 gene ampC, 166
 grupo 2 de Bush, 17–18
 inducible, 17, 166
 metalo-, 158
 OXA-, 160
 Prevotella, 204
 producción inducida, 109
 ROB-1, 184 TEM-1, 184, 198
 Beta-lactamasas ampC, 158
 Beta-lactamasas BRO-1, 198
 Beta-lactamasas BRO-2, 198
 Beta-lactamasas CTX-M, 158
 Beta-lactamasas de espectro extendido
 (BLEE), 157–58
 Beta-lactamasas ROB-1, 184
 Beta-lactamasas TEM-1, 184, 198
 Beta-lactámicos
 actividad en bacterias gram-positivas, 7
 en bacteria gram-negativas, 6
 reporte de resultados, 112
 resultados de *S. aureus*, 139
 BioMerieux, 97
 BLEE, SHV, 158
 Bombas de eflujo, 9
 Burkholderia cepacia, 157, 178
 Burkholderia mallei, 30
 Burkholderia pseudomallei, 30
- C**
 Caldo Brucella, 207
 Caldo Mueller-Hinton, 54, 108, 139
 Caldos de cultivo, 70
 Capa de mureina, 4, 5
 Capa de péptidoglicano, 4, 5, 6
 Capnocytophaga ochracea, 157
 Carbapenemes, 158, 172
 Cefalexina, 35
 Cefalosporinas
 beta-lactamasas y, 15
 enterococos y, 15
 relacionamiento, 84
 selección, 36–37
 Cefalotina, 35
 Cefamicinas, 204
 Cefazolina, 74–75
 Cefepime, 148, 172
 Cefotaxima
 cultivo *E. cloacae*, 168
 prueba de estreptococos del grupo
 viridans, 148
 resistencia a *N. gonorrhoeae*, 194
 resistencia a *P. aeruginosa*, 172
 selección de pruebas de CIM, 61
 Cefotetan, 204
 Cefoxitina, 108, 158, 204
 Ceftriaxone, 61, 148, 172
 Centros para el Control y la Prevención de
 Enfermedades (CDC), 111, 193
 Cepas de ATCC para el CC
 anaerobios, 208
 bacterias gram-negativas, 69
 bacterias gram-positivas, 68–69
 descripción, 67–68
E. coli, 174–76
 estreptococos no neumocócicos, 150
 frecuencia de prueba, 71
 Haemophilus, 189
 límites de CC, 30–31
 mantenimiento, 70
N. gonorrhoeae, 194
P. aeruginosa, 174–76
 pruebas de CIM, 59
 rangos aceptables, 67
S. pneumoniae, 138
 selección, 67
 Chlamydia trachomatis, 191–92
 Ciprofloxacina, 33, 172, 205
 Cistitis, 155
 Citoplasma, 4
 Citrobacter, 157
 Citrobacter freundii, 33–34, 85, 86, 159
 Clindamicina, 105, 109–10, 128
 Cloramfenicol
 adherir a la subunidad 50S, 8
 anaerobios y, 204, 205
 resistencia de *S. maltophilia*, 177
 resistencia de *S. pneumoniae*, 138
 Cloranfenicol acetil transferasa, 9
 Clostridium, 203
 Clostridium botulinum, 203
 Clostridium perfringens, 203
 Clostridium tetani, 203
 Colistina, 175
 Conjugación, 10
- Control de calidad. Vee Cepas de ATCC
 para el CC
 anaerobios, 208
 cepas de control de Enterococcus, 129
 cepas de *S. aureus*, 113
 controles, 124
 definición, 65
 documentación, 70
E. coli, 176
 Enterobacteriaceae, 167
 estreptococos no neumocócico, 150
 Haemophilus, 189
 límites para bacterias no fastidiosas,
 30–31
 lista de control de precisión, 82
N. gonorrhoeae, 194
N. meningitis, 197
P. aeruginosa, 174, 176, 178
 problemas del sistema, 77
 problemas fortuitos, 77
 pruebas de CIM, 60
 responsabilidades del fabricante, 95
 responsabilidades del usuario, 79, 95
 rutina diaria, 78
 rutina semanal, 79
 sistemas comerciales, 96
 Control de pureza, 55
 Costos tablas de NCCLS, 35
 Crecimiento de fase log, 41–42
 Criterios de interpretación, 28, 108–9
 Cromosomas
 bacterial, 4
 mutación, 10
- D**
 Diagrama de flujo, 90
 Diámetro de zona, criterios de interpre-
 tación, 28
 Dihidrofolato reductasa, 8
 Dilución en agar, 60, 111
 Documentación
 control de calidad, 70
 instrucciones adjuntas, 94–95
 políticas de verificación, 85–90
- E**
 Eficacia Clínica, 35
 Egerthella (Eubacterium) lentum ATCC
 43055, 208
 El Comité Nacional de Estándares de Labo-
 ratorio Clínico (NCCLS)
 cuadro 2A del documento M100, 161–62
 cuadro 2B del documento M100,
 173–75
 cuadro 2G del documento M100, 139

- cuadro 2H del documento M100, 149
 documento M11, 205–6
 documento M100, 27–28
 documento M100, cuadro 7, 196
 documentos, 25–38
 esquema de numeración, 26–27
 estándares M2, 27, 200
 estándares M7, 27, 53, 58, 200
 M100, 106
 M100-S14 (M7), 229
 pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, 25–26
 S14, 173
 sistemas comerciales y, 97
 tabla M100, 67
 tabla 1 del documento M100, 173, 175, 177
 tablas, 27–28 El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, 94. Vee también El Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS)
- Endocarditis bacteriana, 146
 Endotoxinas, 4
 Enmiendas para el Mejoramiento del Laboratorio Clínico de 1988, 66
- Enterobacter
 beta-lactamasas inducibles, 159
 producción de BLEE, 157
 verificación de resultado, 85
- Enterobacter cloacae, 87
 caso de estudio, 156–57, 167–68
 pruebas de difusión de cefotaxima, 168
- Enterobacteriaceae, 155–70
 actividad de cefalosporinas, 84
 actividad de penicilina, 84
 antecedentes, 155
 antimicrobianos para pruebas de, 28
 beta-lactamasas CTX-M, 158
 beta-lactamasas en, 157–60
 caso de estudio, 156–57
 como interpretar los resultados, 161–62
 condiciones de prueba, 67
 control de calidad, 167
 criterios de interpretación, 28
 ejercicio de prueba, 31–33
 estrategias de prueba, 161
 producción de ampC, 158
 resistente a amikacina, 84
 resistente a impenem, 84
 verificación de resultado, 84
- Enterococcus, 119–34
 antecedentes, 119
 caso de estudio, 119–26
 cepa de control de calidad, 129
 diferenciación de, 126
 estrategia de pruebas, 122–23
 patrones de susceptibilidad, 122
 pruebas de beta-lactamasa, 123
 reporte erróneo, 128
 reporte de resultado, 84
 resistencia en, 120–22
 resultados, 123
 verificación de resultado, 84
- Enterococcus avium, 122
 Enterococcus casseliflavus, 122, 126
 Enterococcus durans, 122
 Enterococcus faecalis
 ATCC 29212, 68, 124, 125, 129
 ATCC 51299, 68, 124, 125, 129
 diferenciación de, 126
 ERV, 122
 patrones de susceptibilidad, 122
 resistencia en, 84, 120
 verificación, 88
- Enterococcus faecium
 caso de estudio, 129–30
 diferenciación de, 126
 ERV, 122, 128–29
 patrones de susceptibilidad, 122
 resistencia en, 84, 120
- Enterococcus gallinarum, 122, 126
 Enterococcus raffinosus, 122
- Enzima, mecanismos de resistencia, 8
 Enzimas K1, 158
 Enzimas que modifican los aminoglucósidos, 9
- Eritomicina, 105
 Errores de interpretación, 30
 Erysipelothrix rhusiopathiae, 148
 Escarlatina, 145
 Escatogramas, 29
 Escherichia coli
 ATCC 25922, 69, 167, 174, 176, 178
 ATCC 35218, 69, 167, 174, 176, 178
 producción de ampC, 158
 producción de BLEE, 157, 166
 resistencia a la vancomicina, 9
 verificación, 85
 verificación de resultado, 85
- Espacio periplásmico, 4, 8–9
 Estafilococos, 41, 108–9. Vee también
 Streptococos del grupo viridans;
 organismos específicos
- Estafilococos coagulasa negativa (CoNS), 103, 106
 Estándar de la turbidez de látex, 40
 Estándar de la turbidez de sulfato de bario, 40
 Estándares de McFarland, 4, 228
 Estandarización, 40–41
 Streptococos. Vee organismos específicos
 beta-hemolíticos, 145
 grupo A, 145
 grupo B, 145
 incubación, 56–57
 suspensión directa de colonias, 40
- Streptococos beta-hemolíticos, 145
 colonias grandes, 149
 colonias pequeñas, 149
 estrategia de prueba, 147–48
 resistencia a cefalosporinas, 147
 resistencia a la penicilina, 146
- Streptococos del grupo B, 145
 Streptococos del grupo viridans, 145, 146.
 Vee también organismos específicos
- Streptococos no neumocócicos, 145–52
 ATCC 49619, 151
 caso de estudio, 146–51
 clasificación, 145
 como reportar resultados, 150
 criterios de interpretación, 149–50
 estándares de NCCLS, 148
- Streptogramina B, 147
 Streptograminas, 137
- ## F
- Fibrosis quística, 171–73
 Fiebre reumática, 145
 Flujo de trabajo para laboratorios, 90
 Flujograma del proceso de vigilancia, 131
 Flujograma para dilución, 56
 Fluoroquinolonas, 8
 Fosfotransferasas de aminoglucósido (AAD), 121
 Fusobacterium, 203
- ## G
- Gatifloxacina, 205
 gen bla SHV-1, 18
 gen rpo B, 196
 genes ampC, 158–60
 genes erm, 105, 109, 147
 genes mecA 105, 106, 112
 genes mefA 137, 147
 genes msrA, 105, 109
 Gentamicina, 172, 174
 Glomerulonefritis, 145
- ## H
- Haemophilus, 183–89
 H. influenzae y, 183
 incubación, 44, 57, 187
 interpretación de resultados, 188
 preparación del inóculo, 187
 reporte de resultados, 188
- Haemophilus influenzae
 ATCC 49247, 69, 189

ATCC 49766, 189
 ATCC 700603, 69
 caso de estudio, 184
 estrategia de prueba, 185–88 Haemophilus y, 183
 resistente a ampicilina, 84
 resistente a cefalosporinas, 84
 vacuna tipo B, 183
Hafnia alvei, 155
Helicobacter pylori, 30
 Hisopos, 42
 Hoja de registro, 70

I

Impinem, 84, 87, 205
 Incubación, 44, 57
 Infección de las vías urinarias (IVU), 11
 Infecciones de las vías respiratorias, 183
 Infecciones no meníngeas, 138
 Inhibidor-R TEM, 157
 Inoculación, placas, 42–43
 Inóculo
 concentraciones, 60
 control de pureza, 55
 pruebas de CIM, 55
 suspensión, 40–42
 Instrucciones adjuntas, 94–95

K

Klebsiella, 85, 166
Klebsiella oxytoca, 158
Klebsiella pneumoniae
 ATCC 700603, 167
 producción de BLEE, 157, 164–67
 producción de SHV, 157
 resistencia antimicrobiana en, 16
 verificación, 87

L

Lactobacillus, 148
Leuconostoc, 148
 Levofloxacin, 33–34, 205
 Límites
 CIM, 29, 58, 59
 CIM de oxacilina, 108
 criterios de interpretación de difusión por disco, 29
 Lincosamidas, 137, 147
 Lineamientos de verificación, 83–90
 Linezolid, 8, 139
 Lipopolisacáridos, 4
 Lipoproteínas, 4
 Lista de control de precisión, 82

M

Macrodilución en caldo, 61
 Macrólidos
 resistencia a, 9, 105
 resistencia a *S. pneumoniae*, 135
 resistencia de estreptococos beta-hemolíticos, 147
 unión a la subunidad ribosómica 50S, 7
 Membrana, externa, 3, 9
 Membrana citoplásmica, 4, 7
 Meningitis, bacterial, 138
 H. influenzae y, 183
 límites beta-lactámicos, 140
 N. meningitidis, 194–96
 S. pneumoniae y, 135
 Metallo-beta-lactamasas, 158
 Metilasa ribosómica, 137
 Método PDM de epsilómetro, 97
 Metronidazol, 205
 Microdilución en caldo
 B. fragilis, 206
 detección VISA/VRSA, 110–11
 Enterococcus, 123
 panel de CIM, 54–56
 prueba de CIM, 108–9
 Minociclina, 177
Moraxella catarrhalis, 199–200
Morganella morganii, 157, 159
 Moxalactam, 178
 Moxifloxacin, 205
 Mutación, resistencia y, 10

N

Neisseria gonorrhoeae, 194
 antecedentes, 191
 ATCC 49226, 69, 193–94
 caso de estudio, 192
 estándares de prueba, 193
 estrategia de prueba, 193
 incubación, 44
 interpretación de resultados, 193–94
Neisseria meningitidis
 antecedentes, 194
 caso de estudio, 194–95
 prueba, 196
 resultados, 196–97
 Neumonía adquirida en la comunidad, 135, 140
 Non-Enterobacteriaceae
 antecedentes, 171
 caso de estudio, 174–75 estrategia de prueba, 173
 interpretación de resultados, 173
 reporte de resultados, 173

O

Ofloxacin, 191, 205
 Oftalmia neonatal, 191
 Orina, como reportar resultados, 127–28
 Otitis media, 135, 183–84
 OXA-beta-lactamasas, 160
 Oxacilina
 criterios de interpretación, 108–9
 discos, 19
 prueba de CIM, 110

P

Pared Celular, 3–4, 5, 6
Pediococcus, 148
 Penicilinas, 15, 61, 84
 Piocianina, 171
 Plásmidos, 10, 16, 159–60
 Polimixina, 7, 175
 Porinas, 3, 9, 162
Porphyromonas, 203
 Preguntas del médico, 33–34
Prevotella, 203
Propionibacterium, 203
 Proteínas de unión de penicilina (PBB), 105
 acción de beta-lactámicos en, 6
 mutaciones, 10
 prueba molecular, 112
 resistencia en enterococos, 120
 S. pneumoniae, 134
Proteus, 85, 157
Proteus mirabilis, 47–48, 166
Proteus penneri, 159
Proteus vulgaris, 159
 Providencia, 85, 159
 Prueba de beta-lactamasas
 B. fragilis, 207
 Enterococcus, 123
 H. influenzae, 186–88
 métodos, 19–20
 N. meningitidis, 195
 Prueba de detección en oxacilina agar-sal, 111–12, 113
 Prueba de difusión por disco, 39–52
 Prueba de perfeccionamiento, 71
 Prueba E, sistemas manuales, 97
 Prueba molecular, 112 Prueba tamiz de agar vancomicina, 123–24
 Pruebas de concentración inhibitoria mínima (CIM), 53–63
Acinetobacter, 175
 agentes potenciales de bioterrorismo, 30
 antecedentes, 53–54

- B. fragiles, 207–8
 como interpretar resultados, 58
 como leer las placas, 57–58
 concentración del inóculo, 60
 confirmatorias, 163–64
 control de calidad, 60
 control de las variables de la prueba, 58
 difusión de disco vs., 61
 Documento M7, 27
 E. cloacae, 168
 Enterococcus, 123
 estreptococos no neumocócicos, 149
 flujograma para dilución, 56
 H. influenzae, 187
 incubación, 55–56
 límites, 29, 59, 109
 macrodilución en caldo, 61, 108–9
 N. meningitidis, 195
 oxacilina, 110
 P. aeruginosa, 175
 panel de microdilución en caldo, 54
 penicilina intermedio, 109
 prueba de dilución en agar, 54, 60
 prueba de metal-alfa-D-glucopranósido (MGP), 126
 prueba para determinar presencia de BLEE, 162–63
 pruebas de tamizaje para HLAR, 125–26
 rango completo, 59
 S. aureus ATCC 29213, 113
 S. pneumoniae, 139
 Streptococcus, 149
- Pruebas de la turbidez, 40
 Pruebas de motilidad, 126
 Pruebas de pigmento, 126
 Pruebas de susceptibilidad (PSA), 39–40, 83
 comercial, 93
 instrumentos automatizados, 83
 programa para AC, 65–67
- Pruebas tamiz de sinergia, 124–25
- Pseudomonas aeruginosa
 actividad de cefalosporinas, 84
 actividad de penicilina, 84
 antecedentes, 171
 antimicrobianos para pruebas de, 28
 ATCC 27853, 69, 167, 173, 176, 178
 caso de estudio, 61, 171–73 control de calidad, 174
 estrategia de prueba, 175
 interpretación de resultados, 173
 OXA-beta-lactamasas, 160
 producción de BLEEs, 157
 prueba de difusión de disco, 49–50, 173
 reporte de resultados, 173
 verificación, 88
 verificación de resultados, 85
- Pseudomonas maltophilia. Vee Stenotrophomonas maltophilia
- Puntos fuera del campo, porcentaje de, 29
- ## Q
- Quinolonas, 9, 205
 Quinupristina-dalfopristina, 84
- ## R
- Reglas básicas de bioseguridad, 227–30
 Repitiendo la prueba, 84–85, 161–62
- Reportes
 algoritmos para, 35–37
 beta-lactámicos, 112–13
 Enterococos, 128
 ERV, 128–29
 estreptococos no neumocócico, 146
 resultados de orina, 127–28
 resultados de sitios estériles, 127
- Resistencia
 a agentes antimicrobianos, 8–9
 a aminoglucósidos, 121
 a vancomicina, 106
 adquirida, 9–10
 en enterococos, 122
 Estafilococos, 104–6
 intrínseca, 9–10
 mediada por msrA, 105
 pruebas de difusión de disco, 48
 tablas de NCCLS, 35
- Resistencia a aminoglucósidos, 121
 Acinetobacter, 174
 Enterobacteriaceae, 160
 P. aeruginosa, 172
 S. maltophilia, 177
- Resistencia a amoxicilina, 184, 186–88
- Resistencia a beta-lactámicos
 Acinetobacter, 174
 P. aeruginosa, 172
 S. maltophilia, 177
 S. pneumoniae, 136, 138–39
- Resistencia a espectinomicina, 193
- Resistencia a fluoroquinolonas
 Acinetobacter, 175
 Enterobacteriaceae, 160
 H. influenzae, 185
 N. gonorrhoeae, 193
 P. aeruginosa, 172–73
 S. maltophilia, 177
 S. pneumoniae, 137
- Resistencia a la ampicilina, 16, 17
 E. faecalis, 84
 enterococos, 120–21
 estreptococos del grupo viridans, 148
 H. influenzae, 84, 184, 186–88
- Resistencia a la penicilina, 16
 B. fragilis, 204
 beta-lactamasas y, 15
 E. faecalis, 84
 enterococos, 120–21
 estreptococo beta-hemolítico, 146
 estreptococos del grupo viridans, 146, 148
 N. gonorrhoeae, 192
 S. aureus, 103, 104
 S. pneumoniae, 136
- Resistencia a las cefalosporinas, 162
 B. fragilis, 204
 estreptococo beta-hemolítico, 146
 estreptococos del grupo viridans, 147
 H. influenzae, 84, 184
 P. aeruginosa, 172
 S. pneumoniae, 136
- Resistencia a tetraciclinas, 138, 147, 193
- Resistencia a vancomicina, 106
 adquirida, 122
 clasificación de, 121
 estreptococos del grupo viridans, 145
 intrínseca, 122
 S. aureus, 84, 103
- Resistencia adquirida a vancomicina (ERV), 122, 128–29, 130–31
- Resistencia completa a vancomicina (VRSA), 106, 110
- Resistencia heterogénea, 48, 107
- Resistencia homogénea, 48, 107
- Responsabilidades del fabricante, 79, 95
- Responsabilidades del usuario, CC, 79, 95
- Resultados de pacientes, 82
- Ribosomas
 resistencia a los macrólidos, 9
 subunidad 30S, 7
 subunidad 50S, 7
- Ribosómicos de ARN
 metilación, 9
 mutaciones, 137
- Rifampicina, 8, 137, 195–96
- Ruta metabólica, 9 Rutas de administración, 34–35
- ## S
- S. aureus con resistencia “borderline” a la oxacilina, 105
- S. aureus glicopéptido-intermedio (GISA), 106
- S. aureus resistencia a oxacilina (ORSA), 103–5, 106, 113–15

- S. aureus* resistente a oxacilina/meticilina (MRSA), 89, 104–5. Vee también *Staphylococcus aureus*, ATCC 43300
S. aureus vancomicina-intermedio (VISA), 106
Salmonella, 157, 167
 Selección de colonias, 40
Serratia marcescens, 85, 157, 159
Shigella, 158, 167
Shigella dysenteriae, 157
 SHV, 157
 SIDA, 184
 Síndrome de choque tóxico, 145
 Sinergia bactericida, 121
 Síntesis de proteínas, 7–8
 Sistema de clasificación de Bush, 17
 Sistema de la clasificación de Ambler, 17
 Sistema Vitek, 97
 Sistemas comerciales, 93–100
 Sistemas de calidad (SC), 65, 91
 Sistemas de microbiología automatizado MicroScan, 97–98
 Sistemas expertos de software, 83
 Sistemas manuales de comercial, 97
 Sitios estériles, 127
Staphylococcus aureus
 antecedentes, 103–17
 ATCC 25923, 68, 113
 ATCC 29213, 68, 111–12, 113
 ATCC 43300, 68, 111–12
 caso de estudio, 113–15
 coagulasa negativa (CoNS), 103–4
 criterios de interpretación de oxacilina, 108–9
 glicopéptido-intermedio (GISA), 106
 prueba de detección “screening” para oxacilina en agar-sal, 111–12
 resistencia a la penicilina, 16
 resistencia a vancomicina, 84
 resistencia completa a vancomicina (VRSA), 106
 resistencia heterogénea, 48
 resistencia homogénea, 48
 vancomicina-intermedio (VISA), 106
 verificación, 89
 verificación de resultados, 85
Staphylococcus epidermis, 104
Staphylococcus saprophyticus, 104, 113
Stenotrophomonas maltophilia, 84, 176–78
Streptococcus, incubación, 44
Streptococcus agalactiae, 145
Streptococcus mitis, 146
Streptococcus pneumoniae, 135–43
 antecedentes, 135
 ATCC 49619, 68, 141, 199
 autólisis, 141
 caso de estudio, 136
 control de calidad, 141
 criterios de interpretación CIM, 140
 estrategia de prueba, 138
 incubación, 44, 56–57
 métodos de prueba, 135–39
 portadores, 135
 resistencia a beta-lactámicos, 136
 selección de prueba, 61
 vacuna, 135–36
 verificación, 89–90
 verificación de resultados, 85
Streptococcus pyogenes, 145
Streptococcus sanguis, 146
 Sulfamethoxazole, 47–48
 Sulfanomidas, 8, 47–48, 196
 Suspensión de colonias, 40–41, 55
- T**
- Teicoplanina, 121
 TEM, 157
 TEM BLEE, 158
 Tetraciclinas, unirse, 7
 Ticarcilina, 16
 Timidilato síntesis, 9
 Tobramicina, 172, 174
 Topoisomerasa IV, 9, 172
- TouchScan-SR, 98
 Transducción, 10
 Transformación, 10
 Transposición, 10, 16
 Transposones, 10
 Trimetoprima, 8
 Trimetoprima-sulfamethoxazole enterococos y, 128
 H. influenzae, 185
 P. mirabilis con brotes, 47–48
 resistencia a *S. maltophilia*, 84
 resistencia a *S. pneumoniae*, 138
 resistencia antimicrobiana, 11
- U**
- Úlceras, diabéticas, 203
 Unión de aminoglucósidos, 7
- V**
- Vacunas
 H. influenzae tipo B, 183
 S. pneumoniae, 135–36
 Verificación
 políticas, 85–90
 reporte de laboratorio, 85–90
 sistemas comerciales, 96
 sistemas expertos, 83
 Verificación-sistemas expertos, 83
Vibrio cholera, 4, 30
- X**
- Xanthomonas maltophilia*. Vee *Stenotrophomonas maltophilia*
- Y**
- Yersinia pestis*, 30