

El antibiograma.

Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I)

EMILIA CERCENADO^a y JESÚS SAAVEDRA-LOZANO^b

^aServicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

^bServicio de Pediatría. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

ecercenado@terra.es; jesaave@yahoo.es

El estudio de la sensibilidad a antimicrobianos de las diferentes bacterias aisladas en muestras biológicas tiene 2 objetivos fundamentales: guiar al clínico en la elección del mejor tratamiento individual, y monitorizar la evolución de la resistencia bacteriana con objeto de revisar el espectro del antimicrobiano y poder actualizar los tratamientos empíricos¹. Este estudio se realiza mediante el antibiograma, que mide la sensibilidad de una bacteria frente a diferentes antimicrobianos *in vitro* y a partir de estos resultados predice la eficacia *in vivo*. Con un antibiograma se pueden obtener resultados cualitativos que indican si la bacteria es sensible o resistente a un antibiótico, o cuantitativos que determinan la concentración mínima (CMI)

de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano (en µg/ml o en mg/l). La interpretación de los resultados del antibiograma (sensible, intermedio o resistente) se realiza en función de los valores establecidos por diferentes comités, como el Clinical and Laboratory Standards Institute en Estados Unidos², el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing en Europa³ y la Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos⁴. Estos comités determinan y establecen puntos de corte basados en propiedades microbiológicas, farmacocinéticas y de eficacia clínica, para definir la sensibilidad (éxito terapéutico) o resistencia de las diferentes especies bacterianas a cada antimicrobiano^{5,6}. En este capítulo se desarrollan aspectos relacionados con las técnicas microbiológicas del antibiograma, y se describen algunos ejemplos de fenotipos de resistencia característicos de algunas especies. En un próximo capítulo se profundizará más acerca de los fenotipos de resistencia, básicos para entender la lectura interpretada del antibiograma.

Puntos clave

- El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se realiza principalmente por técnicas de dilución o de difusión.
- Las técnicas de dilución proporcionan resultados cuantitativos (concentración mínima inhibitoria, CMI) y las de difusión cualitativos (sensible, intermedio, resistente). Ambos métodos son comparables ya que hay una correlación directa entre el diámetro del halo de inhibición con un disco y la CMI.
- Las técnicas bioquímicas y genéticas permiten detectar el mecanismo o el gen de resistencia en minutos u horas.
- La realización de un antibiograma se basa en el patrón de resistencia de cada bacteria. Así, los antibióticos a los que esa bacteria es intrínsecamente resistente o cuya sensibilidad puede inferirse por otros, no suelen informarse en el antibiograma.
- Los patrones de antibiograma poco frecuentes o imposibles requieren confirmación, ya que no responden a mecanismos de resistencia conocidos.

Técnicas de estudio de sensibilidad a los antimicrobianos

El estudio de la sensibilidad *in vitro* de las bacterias a los antimicrobianos se realiza mediante métodos fenotípicos (técnicas de dilución y de difusión), bioquímicos y genéticos⁷. Los *métodos fenotípicos* (antibiograma) son los más utilizados. Consisten en enfrentar un inóculo bacteriano estandarizado a una única o a diferentes concentraciones de antibiótico. La interpretación de los resultados obtenidos permite clasificar a los microorganismos en categorías clínicas: sensibles, intermedios o resistentes. Hay que tener en cuenta que no siempre un valor de CMI más bajo indica mayor actividad de este antimicrobiano, ya que las CMI que definen la sensibilidad o resistencia son diferentes para cada especie bacteriana y cada antimicrobiano. Si un microorganismo es sensible indica que con las dosis habituales se espera una evolución favorable de la infección, siempre

que se alcancen valores adecuados en el lugar de la infección, lo que en ocasiones no es posible (p. ej., en el sistema nervioso central). Por el contrario, si el microorganismo es intermedio o resistente, es probable que la evolución sea desfavorable. La interpretación de la sensibilidad predice mejor el fracaso (cuando es resistente) que el éxito de un tratamiento.

Entre los métodos fenotípicos, las *técnicas de dilución* determinan la CMI utilizando un medio líquido (dilución en caldo) o un medio sólido (dilución en agar) para disolver las diferentes concentraciones del antimicrobiano. El medio estandarizado para la realización del antibiograma es el medio Mueller-Hinton, al que se le añade sangre u otros suplementos para bacterias que no crecen en él. La CMI es la dilución más baja de antimicrobiano en la que no se observa crecimiento bacteriano. La dilución en caldo suele realizarse en micrométodo (microdilución), en paneles multipocillos, y es el sistema mayoritariamente adoptado por los sistemas automáticos comerciales para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos. En estos sistemas, la lectura de los valores de CMI y la interpretación de resultados se realizan de forma automática.

Las *técnicas de difusión* emplean discos de papel impregnados con una solución estandarizada de antibiótico que se disponen sobre la superficie de un medio sólido previamente inoculado en su superficie con una suspensión bacteriana. Tras un período de incubación de 18 h, el diámetro del halo formado está en relación con el grado de sensibilidad del microorganismo. La carga del disco está ajustada para que los halos de inhibición permitan diferenciar los microorganismos sensibles de los resistentes y pueda establecerse una correlación con los valores de CMI: halos pequeños se relacionan con valores altos de CMI (resistentes) y halos grandes con CMI bajas (sensibles) (fig. 1A). Otra técnica de difusión es el E-test, que además permite la determinación directa del valor de la CMI (fig. 1B). Utiliza tiras de plástico impregnadas con un antibiótico en concentraciones decrecientes. Al contacto de la tira con el agar, el antibiótico difunde e impide el crecimiento del microorganismo. Después de la incubación se observa una zona de inhibición en forma de elipse: el valor de la CMI es el punto de intersección de la elipse con la tira y está indicado en la escala impresa sobre la superficie de la tira. Esta técnica puede utilizarse directamente sobre muestras clínicas para obtener resultados preliminares en menos de 24 h, que siempre deben confirmarse mediante pruebas de sensibilidad estandarizadas con bacterias en cultivo puro⁸ (fig. 2).

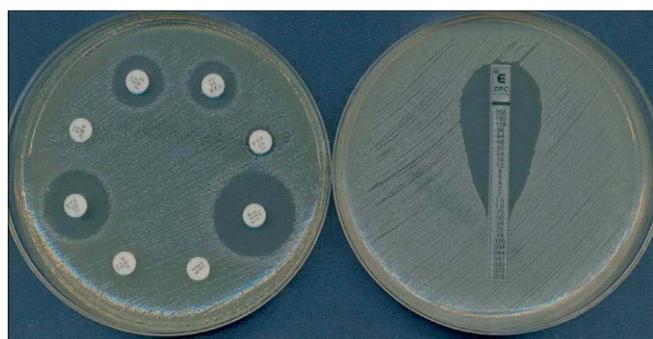


Figura 1. A) Antibiograma por difusión con discos en el que se observa la presencia de halos de inhibición. B) Antibiograma por E-test en el que se observa una elipse de inhibición. El punto donde la elipse corta con la tira es el valor de CMI, en este caso 0,5 mg/l.

Los *métodos bioquímicos* consisten en la determinación del mecanismo por el cual una bacteria es resistente a un antimicrobiano. Los más utilizados son la detección de β -lactamasa con discos impregnados con una cefalosporina cromogénica que cambia de color cuando se hidroliza (método que se utiliza para la detección rápida de la resistencia a ampicilina en *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp. y *Moraxella* spp.), o la detección de la PBP2a responsable de la resistencia a cloxacilina en *Staphylococcus aureus*, por una técnica de aglutinación con látex. Finalmente, los *métodos genéticos* detectan genes de resistencia, generalmente mediante técnicas de PCR, como en el caso del gen *mecA* que codifica la producción de la PBP2a.

Del antibiograma a la práctica clínica

Como ya se ha indicado, el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos de las diferentes bacterias aisladas en muestras biológicas tiene interés individual y epidemiológico. La realización rutinaria del antibiograma proporciona los patrones de resistencias locales y regionales que deben actualizarse periódicamente, ya que éstos pueden cambiar sustancialmente en cortos períodos⁹. Por otra parte, el antibiograma también puede ayudar a diferenciar entre microorganismos verdaderamente patógenos o contaminantes (aislamientos sucesivos de estafilococo coagulasa negativo en hemocultivos con diferente sensibilidad indicaría contaminación cutánea) y en la evaluación inicial ante la sospecha de un brote nosocomial (aislamiento en distintos pacientes de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasa de espectro extendido [BLEE]).



Figura 2. Antibiograma mediante E-test directo de una muestra de LCR de un paciente con meningitis por *Streptococcus pneumoniae*. El medio utilizado contiene sangre de carnero necesaria para el crecimiento de *S. pneumoniae*. Se observa una elipse de inhibición con la tira de cefotaxima. El punto donde la elipse corta con la tira es el valor de CMI, en este caso 0,75 mg/l.

Lectura interpretada del antibiograma

El análisis de los resultados de sensibilidad es un aspecto esencial para una adecuada información del antibiograma y tiene una gran trascendencia clínica¹⁰. En este sentido, la lectura interpretada del antibiograma analiza los fenotipos de sensibilidad y permite deducir posibles mecanismos de resistencia. Además, este proceso permite inferir la sensibilidad de antibióticos no estudiados en el antibiograma y la corrección, en su caso, de falsas sensibilidades observadas *in vitro*, como ocurre en el caso del antibiograma de una enterobacteria con una BLEE, en el que no siempre aparecen como resistentes todas las cefalosporinas, si bien, en la práctica debe evitarse su uso. Asimismo, favorece la adecuación del tratamiento, el control de las políticas de antimicrobianos, la detección de nuevos mecanismos de resistencia y el conocimiento de su epidemiología¹¹. Un requisito esencial para poder realizar una adecuada lectura interpretada es conocer la identidad del microorganismo estudiado, tanto el género como la especie, ya que sin ella el resultado puede llevar a errores en la utilización de los

antimicrobianos. Así, una cepa de *S. aureus* con CMI de cloxacilina de 1 mg/l es sensible a cloxacilina y a todos los β -lactámicos, mientras que si se trata de un estafilococo coagulasa negativa la CMI de 1 mg/l indica resistencia a cloxacilina. Otro ejemplo es que una CMI de ampicilina de 8 mg/l frente a una enterobacteria indica sensibilidad, pero frente a un estafilococo esta misma CMI indica resistencia, ya que un estafilococo es ya resistente a ampicilina con una CMI de 0,5 mg/l. De esta manera, CMI más bajas no siempre indican mayor actividad y, además, son variables dependiendo del microorganismo y del antibiótico, como se ha indicado anteriormente. También hay otros casos de microorganismos que, aunque pertenecen al mismo género, presentan mecanismos de resistencia diferentes, como es el caso de *Proteus vulgaris* que es siempre resistente a ampicilina, mientras que *Proteus mirabilis* es generalmente sensible; o el de *Citrobacter freundii* que siempre es resistente a ampicilina, amoxicilina-clavulánico y a cefalosporinas de primera y segunda generación, mientras que *Citrobacter koseri* es siempre resistente a ampicilina pero no a amoxicilina-clavulánico.

Otro requisito para poder realizar correctamente la lectura interpretada del antibiograma es conocer el fenotipo de sensibi-

Tabla 1. Fenotipos de resistencia raros o imposibles

Microorganismo	Fenotipo
Cocos grampositivos <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Enterococcus/Staphylococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	Sensibilidad a aztreonam Resistencia a penicilina. No descrita actualmente Resistencia a linezolid, daptomicina, tigeciclina Resistencia a gentamicina y sensibilidad a otros aminoglucósidos (salvo estreptomycin)
<i>Staphylococcus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>	Resistencia a oxacilina y sensibilidad a cefalosporinas Resistencia a vancomicina Sensibilidad a β -lactámicos (aproximadamente 70% de resistencia a cloxacilina)
<i>Enterococcus/Streptococcus pneumoniae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>S. pneumoniae</i>	Resistencia a ampicilina y sensibilidad a amoxicilina-ácido clavulánico Resistencia a ampicilina Resistencia a linezolid
Enterobacterias <i>Klebsiella</i> spp. <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas aeruginosa/Acinetobacter</i> <i>Haemophilus</i> spp. <i>Neisseria meningitidis</i>	Resistencia a carbapenemas Sensibilidad a ampicilina Sensibilidad a ampicilina Resistencia a colistina Resistencia a cefotaxima, carbapenemas y fluoroquinolonas Resistencia a cefotaxima, fluoroquinolonas
Anaerobios <i>Clostridium difficile</i>	Resistencia a metronidazol Resistencia a vancomicina

Cefotaxima es equivalente en cuanto a actividad antibacteriana a ceftriaxona y ampicilina a amoxicilina.

Tabla 2. Microorganismos intrínsecamente resistentes a ciertos antibióticos

Antimicrobiano	Microorganismo resistente
Vancomicina	<i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Erysipelothrix</i>
Cefalosporinas	Anaerobios*, <i>Enterococcus</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i>
Clindamicina, vancomicina, teicoplanina y daptomicina	Bacterias gramnegativas
Clindamicina, cotrimoxazol	<i>Enterococcus</i> spp.
Aztreonam, colistina	Bacterias grampositivas
Fluoroquinolonas, cotrimoxazol	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Nitrofurantoína	<i>Proteus</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Providencia</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp.
Quinupristina-dalfopristina	<i>Enterococcus faecalis</i>

*Las cefamicinas (cefotaxima) tienen buena actividad anaeróbica.

alidad de un microorganismo, ya que hay bacterias que siempre son resistentes a determinados antibióticos y otras que siempre son sensibles, y la desviación de estos patrones indica si el patrón del antibiograma corresponde a un fenotipo habitual, raro o imposible (tabla 1)^{12,13}. Los fenotipos habituales son los aislamientos con mecanismos de resistencia cuya presencia es epidemiológicamente normal en el medio donde se realiza el antibiograma. Un ejemplo de ello son la resistencia a penicilina y sensibilidad a cloxacilina en un aislado de *S. aureus*. Los fenotipos raros son los que presentan resistencias poco habituales, bien porque han sido recientemente caracterizadas o porque son muy poco frecuentes en nuestro medio. Un ejemplo de los primeros es la resistencia a imipenem en *Enterobacter cloacae*¹⁴, y de los segundos las cepas de enterococo resistentes a la vancomicina¹⁵. Finalmente, los fenotipos imposibles no responden a mecanismos de resistencia conocidos y, por tanto, es necesaria su comprobación. Estos fenotipos imposibles, en muchas ocasiones, representan un error en la identificación del microorganismo o bien problemas técnicos en la realización del antibiograma, pero también hay que tener en cuenta que la repetición de estos fenotipos en bacterias correctamente identificadas puede suponer un nuevo mecanismo de resistencia, tal es el caso de la resistencia a linezolid en enterococos¹⁶.

En la tabla 1 se indican algunos ejemplos de fenotipos habituales, raros e imposibles, y en la tabla 2 algunos casos de bacterias intrínsecamente resistentes a ciertos antibióticos.

En un próximo capítulo, en el que se analizarán con mayor detalle los fenotipos de sensibilidad más comunes, se expondrán algunos ejemplos de lectura interpretada del antibiograma.

Bibliografía



● Importante ●● Muy importante

- Sham D. The role of clinical microbiology in the control and surveillance of antimicrobial resistance. *ASM News*. 1996;62:25-9.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: CLSI; 2009.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST): Expert rules in antimicrobial susceptibility testing, 2008. Disponible en: <http://www.srga.org/eucastwt/MICTAB/index.html>
- Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos (MENSURA). Recomendaciones del grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. *Rev Esp Quimioterap*. 2000;13:73-86.
- Jorgensen JH. Who defines resistance? The clinical and economic impact of antimicrobial susceptibility testing breakpoints. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2004;15:105-8.
- Ferraro MJ. Should we reevaluate antibiotic breakpoints? *Clin Infect Dis*. 2001;33 Suppl 3:240-4.
- Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*. 1998;26:973-80.
- Cercenado E, Cercenado S, Marín M, Rico MV, Vicente T, Bouza E. Evaluation of direct E-test on lower respiratory tract samples: a rapid and accurate procedure for antimicrobial susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;58:211-6.
- Saavedra J. Infecciones en pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico: bases para la elección racional de un tratamiento antimicrobiano. 2009. Madrid, 2008. Disponible en: http://infodoctor.org/gipi/guia_abe/.
- Macgowan AP. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62 Suppl 2:105-14.
- Cantón R. Lectura interpretada del antibiograma: ejercicio intelectual o necesidad clínica? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002;20:176-85.
- Courvalin P. Interpretive reading of antimicrobial susceptibility tests. *ASM News*. 1992;58:368-75.
- Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretive reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2001;Suppl S1:87-102.
- Cornaglia G, Russell K, Satta G, Fontana R. Relative importance of outer membrane permeability and group 1 beta-lactamase as determinants of meropenem and imipenem activities against *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:350-5.
- Murray B. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med*. 2000;342:710-21.
- Gonzales RD, Schreckenberger PC, Graham MB, Kakar S, Denbesten K, Quinn JP. Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet*. 2001;357:1179.

Bibliografía recomendada

Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretive reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. J Antimicrob Chemother. 2001;Suppl S1:87-102.

En este artículo se demuestra que si se identifican correctamente los microorganismos y se incluyen en el antibiograma un número adecuado de antibióticos, se pueden inferir los mecanismos de resistencia y obtener la sensibilidad de antibióticos que no están en el antibiograma. Presenta las combinaciones más adecuadas de microorganismo-antibiótico que deben utilizarse en un antibiograma y demuestra cómo reconocer un mecanismo de resistencia utilizando determinados antibióticos como marcadores de ésta.

Cantón R. Lectura interpretada del antibiograma: ¿ejercicio intelectual o necesidad clínica? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2002;20:176-86.

En este artículo se indica la diferencia entre interpretación del antibiograma y lectura interpretada del antibiograma. En el primer caso, se trata de realizar la categorización clínica, es decir, definir como sensible, intermedio o resistente un resultado del antibiograma en función de los valores de CMI o de halos de inhibición establecidos por diferentes comités nacionales e internacionales, y que diariamente realizan los laboratorios de microbiología. Sin embargo, la lectura interpretada consiste en el reconocimiento de los fenotipos de resistencia, lo que permite detectar los mecanismos de resistencia, modificar o interpretar nuevamente la categorización clínica que es incongruente con el mecanismo de resistencia deducido, y deducir los valores de sensibilidad de antimicrobianos no incluidos en el antibiograma. Esta actitud contribuye a la mejor adecuación de los tratamientos y es útil para el control de las políticas de antimicrobianos.

Scheetz MH, Knechtel SA, Malczynski M, Postelnick MJ, Qi C. Increasing incidence of linezolid-intermediate or -resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains parallels increasing linezolid consumption. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:2256-9.

*En este estudio se objetiva una correlación significativa entre el uso de linezolid y la aparición de *Enterococcus faecium* con sensibilidad intermedia o resistencia a este antibiótico. La peculiaridad de este estudio es que la resistencia fenotípica de *E. faecium* se confirmó posteriormente por medio del estudio genotípico. Una vez más se demuestra cómo la presión antibiótica es un factor de riesgo fundamental para la aparición de resistencia antimicrobiana frente a cualquier antibiótico. Así, si se continúa con un aumento del uso de linezolid, la resistencia de *E. faecium* frente a este antibiótico, en la actualidad rara, pasará a ser frecuente.*

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST): expert rules in antimicrobial susceptibility testing, 2008. Disponible en: <http://www.srga.org/eucastwt/MICTAB/index.html>

Página web oficial del EUCAST donde se explica, de una manera detallada y gráfica, con abundante uso de tablas, los fenotipos de resistencia más comunes de las diferentes bacterias, incluyendo fenotipos raros y resistencia intrínseca. Finalmente, se realiza una revisión exhaustiva de las bacterias patógenas humanas más representativas y sus fenotipos de resistencia frente a antibióticos de uso común en la práctica clínica, acompañados de una explicación para cada uno de ellos.