



DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* A PENICILINA POR TÉCNICA DE DIFUSIÓN. COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS

von Specht, M. H. / Grenon, S. L.

Especialidad en Microbiología Clínica. Cátedra de Práctica Hospitalaria y Deontología. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (Universidad Nacional de Misiones). Hospital Provincial de Pediatría de Misiones. marthatovs@yahoo.com.ar

Streptococcus pneumoniae PENICILLIN SUSCEPTIBILITY BY DIFUSION TECHNIQUE. COMPARISON OF TWO METHODS

Pneumococcal Infections caused by drug-resistant strains are an increasing problem requiring the adoption of control strategies and campaigns to promote judicious use of antibiotics.

To screen for pneumococcal penicillin resistance using the Kirby-Bauer disc technique with oxacillin impregnated discs, the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recommends Mueller Hinton Agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood (MHSO).

Since that supplement is not accessible for many laboratories, routine antibiotic sensitivity tests are not performed in many hospitals, and thus empirical therapy could be inappropriate.

The aim of this research is to compare two in vitro disk diffusion techniques to determine *Streptococcus pneumoniae* penicillin susceptibility.

Seventy four strains were used in this study. The technique and the interpretative breakpoint were in accordance with NCCLS criteria for both methods run in parallel, except for the use of 5% serologically typed human blood as supplement to MH agar in the alternative method (MHSB).

The results were adjusted to a straight line, and they were significant ($p < 10^{-4}$). Confidence limits at 95% are 0.959 and 0.167 including value 1. If the breakpoint suggested by NCCLS (20 mm) is changed to 22 mm for MHSB technique, the probability of wrongly considering a strain penicillin resistant, decreases in a 2.4% (2.5 to 0.1%).

Even though a confirmation by the reference technique is required, low complexity laboratories could adopt this accessible screening method.

KEY WORDS: *Streptococcus pneumoniae* - oxacillin - difussion.

ABSTRACT

RESUMEN

Las infecciones por neumococos resistentes constituyen un problema creciente que exige medidas de control, y campañas para promover el uso racional de los antibióticos.

Para establecer la sensibilidad a penicilina (PEN) por difusión, según Kirby Bauer, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda la utilización de Agar Mueller Hinton suplementado con sangre de carnero al 5% (MHSO). Como este suple-

mento no resulta fácilmente accesible, muchos laboratorios no efectúan esta determinación y se recurre a terapias empíricas a veces inadecuadas.

El objetivo del trabajo fue realizar una comparación entre dos medios de cultivo aplicados al método de difusión para la determinación de la sensibilidad a penicilina de *S. Pneumoniae*, utilizando discos de oxacilina.

Se efectuó el estudio en paralelo a 74 cepas. Se siguieron las normas del NCCLS para el desarrollo de la técnica e interpretación de los halos obtenidos, siendo la única variable el suplemento con sangre humana (serológicamente controlada) al 5% como método propuesto (MHSB).

Los resultados se ajustaron a una línea recta, siendo el mismo significativo con $p < 10^{-4}$. Los límites de confianza al 95% son 0,959 y 0,167 que incluyen al valor 1. Con una corrección en el valor de corte recomendado por NCCLS de 20 mm para interpretar como sensible a una cepa, a 22 mm para el método alternativo propuesto (MHSB), se logró reducir en un 2,4% (de 2,5 a 0,1%) la probabilidad de considerar susceptible en forma errónea a una cepa penicilino-resistente.

Si bien ambos métodos requerirían confirmación por métodos de dilución (CIM), sería factible su uso como técnica de tamizaje, tomando como valor de corte 22 mm, pudiendo ser desarrollado en laboratorios de baja complejidad de nuestra provincia.

PALABRAS CLAVES: *Streptococcus pneumoniae* - oxacilina - difusión.

INTRODUCCIÓN

Streptococcus pneumoniae es una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Es agente etiológico de meningitis, bacteriemia con o sin endocarditis, sinusitis y otitis media aguda siendo el más frecuente en neumonía extrahospitalaria [1, 2, 3].

El *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* describe al género como una bacteria Gram-positiva, catalasa-negativa, facultativamente anaeróbica de forma esférica u ovoide de unas 2 μm de diámetro [4].

Los neumococos pueden presentar cápsula o estar desprovistos de ella. Su forma más característica es lanceolada, pueden formar cadenas cortas o estar aislados. En medio líquido, la mayor parte de las cepas capsuladas presenta un crecimiento difuso, mientras que las no capsuladas muestran un crecimiento granular.

Son nutricionalmente fastidiosos, requieren un medio enriquecido para crecer, y atmósfera de CO_2 . Su desarrollo se favorece por la presencia de sangre en el medio. En agar sangre, crecen presentando alfa hemólisis, y colonias con depresión en el centro.

La sensibilidad a optoquina y la solubilidad en bilis de buey, permiten diferenciarlo de otros estreptococos alfa-hemolíticos [5, 4].

Desde su introducción, la penicilina (PEN) y sus derivados han constituido el tratamiento empírico de elección de las infecciones neumocócicas, debido a su excelente actividad bactericida y a las bajas concentraciones del antibiótico requeridas para inhibir la mayoría de las cepas.

Sin embargo, la incidencia mundial de patologías causadas por *S. pneumoniae* con distintos grados de re-

sistencia a penicilina (PEN-R) y a otros agentes antimicrobianos, ha aumentado significativamente a partir de 1970 y en particular en las últimas décadas [6].

Esto ha hecho difícil la elección de la terapia empírica para las infecciones invasivas [7].

En nuestro país, la resistencia global a penicilina es de alrededor de 20%, con variaciones según la zona geográfica considerada [8].

El mecanismo de resistencia de *S. pneumoniae* a los antibióticos beta-lactámicos es cromosómico y se expresa con múltiples cambios en las proteínas ligadoras de penicilina (PLP), permaneciendo como uno de los pocos patógenos a los que nunca se ha descrito producción de beta-lactamasas [1, 2, 8].

Para realizar una correcta terapia antibiótica, se requiere el aislamiento, identificación y la determinación de la sensibilidad del agente etiológico en el laboratorio. *S. pneumoniae* aislados de sangre, LCR, y otros sitios normalmente estériles del organismo deben ser examinados en forma rutinaria para la sensibilidad a la penicilina, como también las cepas provenientes de tratamientos fallidos.

Si bien el método patrón para estos estudios es la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM, de dilución), el método de difusión (más sencillo en su realización) permite determinar la sensibilidad a PEN y a otras drogas [9].

Para llevar a cabo esta técnica, el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) recomienda –para predecir la sensibilidad a penicilina– la utilización de agar Mueller Hinton suplementado con sangre de oveja al 5%, discos de oxacilina e incubación en atmósfera de CO_2 .

Halos de 20 mm o mayores son considerados sensibles, halos menores o iguales a 19 mm son considerados resistentes, debiendo confirmarse mediante métodos de dilución el grado de tal perfil [9, 10].

El éxito de una terapia depende del nivel de resistencia y del sitio de la infección [5].

La participación del laboratorio de microbiología en la detección de las cepas resistentes, resulta de crucial importancia para el tratamiento correcto de las infecciones por neumococos.

Debido al costo implicado en la ejecución de la técnica oficialmente recomendada, la mayoría de las veces está fuera del alcance de algunos laboratorios. La falta de estas determinaciones lleva a terapias empíricas con drogas de mayor espectro y costo. Muchas veces innecesarios, estos tratamientos podrían facilitar la aparición de mayor número de cepas resistentes.

Con el fin de brindar un apoyo a los laboratorios de bajos recursos de la provincia, mediante la sugerencia de un método de *screening* alternativo, y contribuir a un uso racional de los antibióticos, se ha encarado el presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 74 cepas consecutivas y no relacionadas, aisladas de líquido cefalorraquídeo (LCR), líquidos pleurales (LPP), hemocultivos (HEMO), líquido ascítico (LA), y otros líquidos de punción de pacientes pediátricos (>1 mes y < de 14 años) que fueron internados por diferentes patologías en el Hospital Provincial de Pediatría de Misiones, en el período comprendido entre el 1/6/1998 al 30/6/2000.

Las muestras se inocularon en placas de agar sangre (AS), agar chocolate (Ach), caldo tioglicolato, caldo sangre. La incubación se efectuó en atmósfera de CO₂ al 5% a 35 – 37°C durante 24 – 48 horas.

Los microorganismos aislados se caracterizaron por morfología directa (coloración de Gram), y de las colonias, hemólisis alfa, reacción catalasa (portaobjetos) y sensibilidad al disco de optoquina [1, 6, 11].

Las cepas fueron enviadas al Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI - ANLIS) Dr. Carlos G. Malbrán, para su confirmación de especie y determinación del serotipo y factor.

Se determinó la sensibilidad a PEN mediante el método de macrodilución en caldo recomendado por el NCCLS [9], y mediante técnica de difusión en la que se ensayaron monodiscos de oxacilina (OXA, 1ug- Britania, Argentina), y dos medios de cultivo en paralelo y bajo idénticas condiciones de trabajo:

A) Método de difusión efectuado siguiendo las recomendaciones del *National Commitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*: MHSO (Agar Mueller Hinton suplementado con sangre ovina al 5% - Laboratorios Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina).

B) Método alternativo: MSHH (Agar Mueller Hinton suplementado con sangre humana al 5%).

La única variable propuesta a tal efecto es la utilización de sangre humana anticoagulada serológicamente apta obtenida de donantes voluntarios, como suplemento agregado a base MH (Merck, Alemania). Se respetaron todas las demás exigencias establecidas en el documento abajo citado.

Los valores de corte, junto a la metodología empleada, se tomaron de las tablas 2G – M100 – S9: Zone Diameter Interpretative Standards and Equivalent Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Breakpoints for *Streptococcus pneumoniae* de NCCLS 2000 [9, 10].

Se consideraron errores “*minor*” a los que el método propuesto (MSHH) produjo valores diferentes al tomado como referencia en relaciones:

Sensibilidad vs Sensibilidad Intermedia,

Sensibilidad Intermedia vs Sensibilidad,

Resistencia vs Sensibilidad Intermedia, o

Sensibilidad Intermedia vs Resistencia respectivamente,

Errores *major* resultaron de considerar resistente a un aislamiento sensible con MHSO,

Errores *very major* a los que resultaron de considerar sensibles a aislamientos resistentes en MHSO.

El control de calidad se realizó utilizando la cepa de *S. pneumoniae* ATCC 49619, tal como lo sugiere el NCCLS [9].

La conservación de los microorganismos se realizó mediante hisopo seco y técnica en leche descremada al 10%, a –20°C.

El programa EPI INFO versión 6 fue utilizado para la recolección y proceso de los datos, como así también de los resultados obtenidos en el laboratorio; para el análisis de estos se utilizó además el programa EXCEL. Se aplicó para la evaluación regresión lineal simple y chi cuadrada. Un valor P < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Se efectuó CIM a penicilina a 74 cepas, el 65% de estas fue sensible (CIM = o < 0.06 ug/ml), 17% presentó Sensibilidad Intermedia (CIM entre 0.12 – 1ug/ml) y 18% Resistencia (CIM= o > 2 ug/ml).

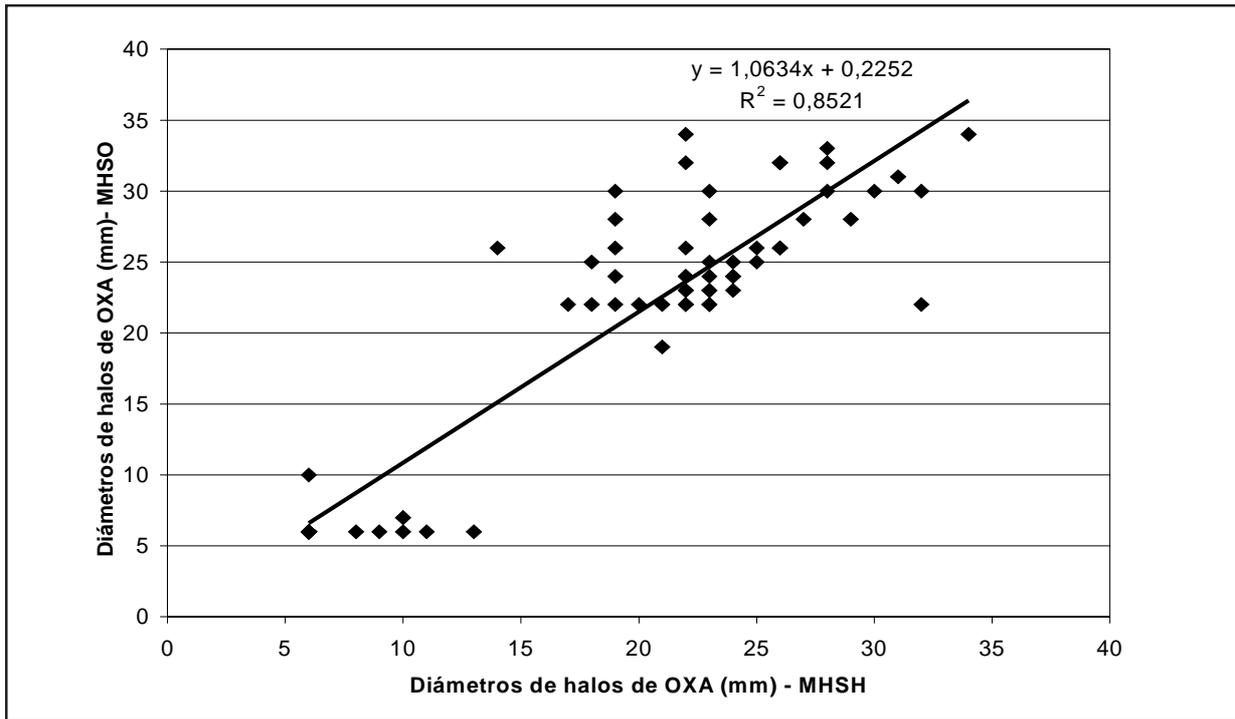


FIGURA 1: *Streptococcus pneumoniae*. Regresión lineal simple: Sensibilidad a Oxacilina por métodos de difusión en placas (MHSO eje Y, MSHH en eje X).

Todas las cepas que presentaron halo de OXA igual o mayores a 20 mm con el método de difusión recomendado fueron inhibidas por concentraciones de PEN iguales o menores a 0,06 µg/ml.

Se ensayó en paralelo la prueba de difusión para OXA utilizando MHSO y MSHH a todas las cepas.

La asociación entre ambos métodos se aprecia en la Figura 1. El diagrama de dispersión se realizó junto a la curva de regresión, siendo la pendiente $b = 1,0634$ y el coeficiente de determinación (R^2) = 0,8521. El intervalo de confianza para 95% fue de 0,959 y 0,167.

A fin de evaluar la posibilidad del uso de MSHH con discos de oxacilina como técnica de tamizaje para definir sensibilidad por difusión a penicilina, se clasificó a

las cepas como sensibles (S) o resistentes (R) utilizando un punto de corte igual al propuesto por el NCCLS (≥ 20 mm). Con estos resultados se construyó la Tabla 1.

Para mejorar el valor predictivo de la prueba y disminuir errores *very major*, se estructuró un nuevo cuadro tomando como valor de corte para definir sensibilidad en MSHH un halo ≥ 22 mm. Con estos valores se construyó la Tabla 2.

DISCUSIÓN

La dispersión entre los resultados obtenidos por métodos de difusión para medir sensibilidad a penicilina, utilizando discos de OXA en MSHH y MHSO, permite

Tabla 1: *S. pneumoniae*. Interpretación de perfiles de sensibilidad. Comparación de métodos MSHH – MHSO con valor de corte para MSHH de 20 mm.

		MHSO		
		R	S	Total
MSHH	R	25 a	9 b EM	34
	S	1 c EVM	39 d	40
	Total	26	48	74

Referencias: MHSO: Agar Mueller Hinton suplementado con sangre de ovejas al 5%. MSHH: Agar Mueller Hinton suplementado con sangre humana al 5%. Error very major: EVM. Error mayor: EM.

Tabla 2: *S. pneumoniae*. Interpretación de perfiles de sensibilidad. Comparación de métodos MSHH – MHSO con valor de corte de 22 mm para MSHH.

		MHSO		
		R	S	Total
MSHH	R	26 a	11 b EM	37
	S	0 c EVM	37 d	37
	Total	26	48	74

Referencias: MHSO: Agar Mueller Hinton suplementado con sangre de ovejas al 5%. MSHH: Agar Mueller Hinton suplementado con sangre humana al 5%. Error very major: EVM. Error mayor: EM.

evaluar el grado de relación entre ambas variables. Los resultados se ajustaron a una línea recta, siendo el mismo significativo con $p < 10^{-4}$ (Figura 1).

Los límites de confianza al 95% son 0,959 y 0,167 que incluyen al valor 1, por lo tanto se puede decir que con ambos métodos se obtiene el mismo valor.

Analizando las Tablas 1 y 2 se puede comprobar que hay un 97,5% de probabilidad de informar como sensible una cepa PEN-S cuando el halo de inhibición utilizando MSHH es igual o mayor a 20 mm (VPN = 97,5%).

El valor predictivo negativo asciende a 99,9% al considerar el valor de corte para MSHH en 22 mm. Teniendo en cuenta esta corrección, se eliminan los errores *very major*, detectados utilizando el punto de corte anterior. Se reduce así de un 2,5% a un 0,1% la probabilidad de interpretar en forma incorrecta como sensible una cepa PEN R.

CONCLUSIONES

Si bien se requeriría la confirmación por el método de referencia (CIM) establecido en las normas NCCLS, el alto valor predictivo obtenido en los ensayos de difusión utilizando MSHH permitiría su uso como técnica alternativa para predecir sensibilidad a penicilina. La accesibilidad a la sangre humana reemplazando a la de oveja, abre una posibilidad a laboratorios de menor complejidad que, cumpliendo estrictos controles de calidad, puedan desarrollar esta importante herramienta.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marcelo Salvi, Ramón Castillo y Élica Horodeski por su colaboración en el aislamiento original de las cepas. Al Dr. Gustavo Silva y al Ing. Miguel E. Schmalko por su aporte en la evaluación estadística. A la división Bacteriología Clínica del INEI ANLIS Malbrán por la confirmación de especies.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liñares, J.; Tubau, F. *Meningitis neumocócica y cephalosporinas de tercera generación*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. Vol 14 (1 – 6) 1996.
2. Liñares, L.; Gracia, D.; Alonso, T. *Streptococcus pneumoniae*: Desarrollo de resistencia a los antibióticos en España. Infect. & Microbiol. Clin. Vol 1, N° 2 Jun 53 – 58. 1989.
3. López, J.; Eres, N.; Fernández, X.; Buri, M. Celulitis por *Streptococcus pneumoniae* asociada a espondilodiscitis tras cuadro de otitis media supurativa. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. Vol 15 N° 3 (171– 172). 1997.
4. Ruoff, K. L.; Whiley, R. A.; Beighton, D. *Streptococcus*. En Manual of Clinical Microbiology Murray, P. R.; Baron, E. J.; Tenover, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H. 7ª Ed. American Society for Microbiology. 1999.
5. Lopardo, H.; Hernández, C. M.; Morales, G. *Infecciones de las vías respiratorias superiores*. Módulo N° 10 Curso a distancia en Microbiología Clínica- Asociación Argentina de Microbiología Clínica – Colegio de Bioquímicos de E. Ríos. 1997.
6. Nagel, A.; Ahumada, C. A.; Mollerach, A.; Mendez, E. *Streptococcus pneumoniae: Detección de cepas resistentes a penicilina y comparación con otros antimicrobianos*. Infect. & Microbiol. Clin. Vol 8, N° 4 95 – 97. 1996.
7. Deeks, S. L.; Palacio, R.; Ruvinski, R.; Kertesz, D. A.; Hortal, M.; Rossi, A.; Spika, J. S.; Di Fabio, J. L.; and the *S. pneumoniae working group*. Risk Factors and Course of Illness among children with invasive penicilin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Pediatrics Vol 103 No 2 (409 - 413)-1999.
8. Casellas, J. M. *Neumococo penicilino resistente*. Microbiología, epidemiología, diagnóstico y tratamiento. En Stamboulian. Infectología para la práctica diaria. Ed. FUNCEI. P.73 – 93.1996.
9. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement.– Vol 19 N° 1. NCCLS. 1999.
10. Rossi, A. *Antimicrobianos*. Módulo No 4. Curso a distancia en Microbiología Clínica - Asociación Argentina de Microbiología - Colegio de Bioquímicos de E. Ríos. 1997.
11. Mandel, G. L.; Douglas, G.; Bennett, J. *Enfermedades Infecciosas. Principios y prácticas*. Tomo II. 3ª Ed. Edit. Méd. Panamericana. 1990.