



Empleo del disco de 1 µg de oxacilina para predecir resistencia a penicilina y ceftriaxona en *Streptococcus pneumoniae*

María Victoria Ovalle Bact. *, Clara Inés Agudelo Bact. *,
Elizabeth Castañeda Ph.D. *

Resumen

Introducción: el Comité Nacional para Estándares del Laboratorio Clínico (NCCLS) recomienda la prueba tamiz con oxacilina (1µg) con el método de difusión de disco para predecir, en *Streptococcus pneumoniae*, tanto la susceptibilidad disminuida a la penicilina (SDP), como la resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Sin embargo, el grado de resistencia se debe establecer con la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antibiótico. **Objetivo:** correlacionar en aislamientos invasores de *S. pneumoniae*, el halo de inhibición de 6 mm con el disco de oxacilina, con la CIM de penicilina y ceftriaxona. **Materiales y Métodos:** se analizaron los datos de 586 aislamientos en los cuales se había determinado tanto la susceptibilidad a la penicilina con el disco de oxacilina (1 µg) como la CIM a la penicilina y a la ceftriaxona, siguiendo los procedimientos e interpretaciones dadas por el NCCLS. **Resultados:** en 99/586 (16,7%) aislamientos

estudiados que presentaron un halo de 6 mm (diámetro del disco) se estableció en 15 (15,2%) resistencia intermedia a la penicilina (CIM 0,125 a 1,0 µg/mL) y en 84 (84,8%) resistencia alta (CIM $\geq 2,0$ µg/mL); con relación a la ceftriaxona, 20 (20,2%) aislamientos fueron sensibles (CIM $\leq 0,5$ µg/mL), 51 (51,5%) presentaron resistencia intermedia (CIM 1,0 µg/mL) y 28 (28,3%) resistencia alta (CIM $\geq 2,0$ µg/mL). **Conclusiones:** una lectura de 6 mm con el disco de oxacilina (1µg) puede servir como indicador de alta resistencia a penicilina con una sensibilidad de 100% y una especificidad de 81,7%. Adicionalmente, puede predecir resistencia intermedia o alta a las cefalosporinas, dato importante para orientar la conducta terapéutica antes de conocer los resultados de la CIM. **Palabras clave:** *Streptococcus pneumoniae*, oxacilina, concentración inhibitoria mínima, penicilina, ceftriaxona. b

Infectio 2001; 5(3): 157-162

* Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia

Correspondencia: Clara Inés Agudelo, Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud. Avenida Eldorado Carrera 50 Zona 6, Bogotá, Colombia.
E-mail: cagudelo@hemagogus.ins.gov.co



Introducción

El incremento de la resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina se ha observado globalmente (1); adicionalmente, un alto porcentaje de los aislamientos que expresan algún grado de resistencia a la penicilina lo hacen también a las cefalosporinas y a otros antimicrobianos, describiéndose así, con mayor frecuencia la circulación de aislamientos multirresistentes (2-4).

La identificación de un aislamiento de *S. pneumoniae*, agente de meningitis, con resistencia a penicilina, hace necesario modificar la terapia antibacteriana (5,6), por lo tanto, una determinación temprana de la susceptibilidad antimicrobiana es de gran importancia para el clínico.

La prueba tamiz con el empleo de un disco con un 1 µg de oxacilina, es recomendada por el Comité Nacional para Estándares de Control del Laboratorio (NCCLS), como un método eficaz para detectar los aislamientos de *S. pneumoniae* con susceptibilidad disminuida a la penicilina (SDP) (7). De acuerdo con los criterios de interpretación recomendados por la NCCLS, los aislamientos que presentan halos ≥ 20 mm son susceptibles a los antibióticos beta lactámicos. Adicionalmente, los aislamientos que presentan una zona de inhibición ≤ 19 mm, se consideran con SDP, sin permitir categorizar el grado de resistencia. En esos casos, la NCCLS recomienda determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), a penicilina y a las cefalosporinas de tercera generación como ceftriaxona, cefotaxima y cefixime (6-8). Sin embargo, para establecer la susceptibilidad de *S. pneumoniae* a las cefalosporinas de tercera generación, es necesario determinar la CIM debido a que no se ha podido establecer una relación entre los tamaños de las zonas de inhibición con los discos de ceftriaxona (Kirby-Bauer) y la CIM (9,10).

En un estudio realizado en el Laboratorio de Salud Pública de Quebec y en el departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina

de la Universidad de Sherbrooke, Quebec, Canadá, se llamó la atención sobre una buena correlación entre el tamaño del halo de inhibición con la oxacilina y la CIM a la penicilina y a la ceftriaxona (6); a menor halo, se requiere una mayor concentración del antimicrobiano (expresada en µg/mL) para inhibir el crecimiento bacteriano.

Debido a la importancia de este hallazgo, por sus implicaciones para un informe oportuno al clínico que guíe su conducta terapéutica, decidimos evaluar en una colección de aislamientos invasores de *S. pneumoniae*, la correlación existente entre los halos de inhibición frente al disco de oxacilina de 1 µg y la CIM tanto a penicilina como a ceftriaxona.

Materiales y Métodos

Aislamientos

Se analizaron los datos de 586 aislamientos invasores de *S. pneumoniae*, provenientes de niños menores de cinco años, recolectados en diferentes hospitales del país y remitidos al Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud desde 1994 hasta el año 2000. Estos aislamientos fueron confirmados y estudiados como parte del proyecto sobre vigilancia de los serotipos y la susceptibilidad antimicrobiana de *S. pneumoniae* (SIREVA – OPS) (11,12).

Susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos había sido establecida con los métodos de difusión de disco (Kirby-Bauer) y de la CIM con la microdilución en caldo, de acuerdo con las recomendaciones de la NCCLS (7,13). A saber, para el Kirby-Bauer se utilizaron discos de oxacilina de 1 µg (Difco), en agar Mueller Hinton (Oxoid) adicionado de sangre de cordero a 5% y una suspensión del microorganismo igual al tubo 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) de la escala de MacFarland; se consideró sensible a la penicilina un halo de inhibición ≥ 20 mm (7). Para la CIM se utilizó penicilina y ceftriaxona de potencias conocidas, en caldo de



Mueller Hinton ajustado con cationes (BBL) y suplementado con 6% de sangre de caballo. Para la interpretación se utilizaron los parámetros de la NCCLS; con la penicilina, sensible a una CIM $\leq 0,06$ $\mu\text{g/mL}$, resistencia intermedia $0,125 - 1,0$ $\mu\text{g/mL}$ y alta resistencia $\geq 2,0$ $\mu\text{g/mL}$; y para ceftriaxona sensible $\leq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$, resistencia intermedia $1,0$ $\mu\text{g/mL}$ y alta resistencia $\geq 2,0$ $\mu\text{g/mL}$. El control de calidad externo para el desarrollo de esta metodología es ejercido por el Centro Nacional para *Streptococcus* (NCS) de Alberta, Canadá, centro internacional de referencia para el estudio SIREVA. Los datos fueron analizados con el programa EPI-Info 6,0 (14)

Resultados

De los 586 aislamientos estudiados, 420 (71,7%) presentaron un halo de inhibición con el disco de oxacilina ≥ 20 mm y fueron clasificados como sensibles, en 409 la CIM fue $\leq 0,06$ $\mu\text{g/mL}$, sin embargo en 11 (2,6%) se determinó una CIM de $0,125$ a $0,5$ $\mu\text{g/mL}$ lo que los clasificó con resistencia intermedia (falsos negativos). Los restantes 166 (28,3%) aislamientos presentaron un halo ≤ 19 mm lo cual los caracterizó con SDP y a su vez, de estos, 99 (16,9%) presentaron un halo de inhibición de 6 mm (diámetro del disco) (Tabla 1).

En estos últimos aislamientos se determinó con la CIM que 84 (85%) fueron altamente resistentes a penicilina, 55 (65,5%) con una CIM de $2,0$ $\mu\text{g/mL}$ y 29 (34,5%) de $4,0$ $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 1).

Con estos resultados se determinó que con los criterios de corte establecidos por la NCCLS, la prueba tamiz con el disco de oxacilina, tiene una sensibilidad de 93,7%, una especificidad de 99,5%, VPP de 98,8% y un VPN 97,4%, para predecir la sensibilidad disminuida a la penicilina.

Cuando se analizaron únicamente los aislamientos con SDP, se encontró que la prueba tamiz con un halo de 6 mm tuvo una sensibilidad de 100% para captar los de alta resistencia, (CIM $\geq 2,0$ $\mu\text{g/mL}$), con una especificidad de 81,7%, VPP 84,8% y VPN 100%.

Al correlacionar en los 586 aislamientos el halo de inhibición con el disco de oxacilina y la CIM a ceftriaxona, se encontró que los 420 aislamientos sensibles con la prueba tamiz y los 67 que presentaron un halo entre 9 – 19 mm fueron sensibles a la ceftriaxona (CIM $\leq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$). Adicionalmente, en los 99 aislamientos con un halo de inhibición de 6 mm (diámetro del disco), 28 (28,3%) presentaron alta resistencia (CIM $\geq 2,0$ $\mu\text{g/mL}$), 51 (51,5%) resistencia intermedia (CIM $1,0$ $\mu\text{g/mL}$) y 20 (20,2%) fueron sensibles (CIM $\leq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 2).

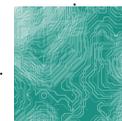
Con estos datos se determinó que de acuerdo con los criterios establecidos por la NCCLS, la prueba tamiz con el disco de oxacilina tiene una sensibilidad de 100% y especificidad de 82,8%, para predecir algún grado de resistencia a ceftriaxona.

Al correlacionar el halo de inhibición a oxacilina con la resistencia a ceftriaxona se encontró que todos los aislamientos que presentaron algún grado de resistencia a ceftriaxona tenían un halo de 6 mm (Tabla 2).

Discusión

S. pneumoniae es la causa más común de neumonía bacteriana adquirida en comunidad, de meningitis, de bacteremia y presenta una alta prevalencia en ciertas infecciones como sinusitis y otitis media (15). La Sociedad Americana de Pediatría, recomienda como tratamiento de elección para las infecciones del tracto respiratorio el uso de penicilina, ampicilina y trimetoprim sulfá (para niños con neumonía), y la administración de cefalosporinas de tercera generación como ceftriaxona o cefotaxima para el tratamiento de meningitis y otitis media (1,4,15,16). La falla en la terapia antimicrobiana en los casos de meningitis y neumonía puede incrementar la tasa de mortalidad (15).

Desde la primera descripción de *S. pneumoniae* con SDP en 1967 en Australia, ha aumentado, a nivel mundial, considerablemente la resistencia a penicilina, cefalosporinas de amplio espectro y otros antimicrobianos (3,5,17). La


TABLA 1

Streptococcus pneumoniae: comparación entre el tamaño del halo de inhibición con el disco de oxacilina de 1 µg y la resistencia alta o intermedia a la penicilina establecida con la CIM (n = 586)

Oxacilina 1 µg		Interpretación y halo en mm			Total
		SDP*		Sensible	
CIM penicilina	µg/mL	6 mm	9-19 mm	≥ 20 mm	
Alta resistencia	4	29			29
	2	55			55
Resistencia intermedia	1	9	5	1	15
	0,5	4	16	1	21
	0,25	2	22	2	26
	0,125		22	7	29
Sensibles	0,06		2	32	34
	0,03			192	192
	0,016			185	185
Total		99	67	420	586

*Sensibilidad = 93,7%
 Especificidad = 99,5%
 VPP = 98,8%
 VPN = 97,4%

TABLA 2

Streptococcus pneumoniae: comparación entre el tamaño del halo de inhibición con el disco de oxacilina de 1 µg y la resistencia alta o intermedia a la ceftriaxona establecida con la CIM (n = 586)

Oxacilina 1 µg		Interpretación y halo en mm			Total
		SDP*		Sensible	
CIM ceftriaxona	µg/mL	6 mm	9-19 mm	≥ 20 mm	
Alta resistencia	4	3			3
	2	25			25
Resistencia intermedia	1	51			51
Sensibles	0,5	10	3		13
	0,25	7	8	2	17
	0,125	3	27	7	37
	0,06		23	28	51
	0,03		3	196	199
	0,016		3	187	190
Total		99	67	420	586

*Sensibilidad = 100%
 Especificidad = 82,8%
 VPP = 45,6%
 VPN = 100%



aparición de estos aislamientos resistentes se traduce en que la selección de los antibióticos para el tratamiento de las infecciones neumocócicas sea cada vez más difícil. En Colombia se ha informado del incremento en la frecuencia de aislamientos con SDP la cual ha pasado de 10% en 1994 a 49,4% en 1999 (11,12).

El amplio uso de la prueba tamiz con oxacilina para predecir la resistencia a la penicilina está basado en su sensibilidad de 93%, similar a la de 93,7%, encontrada en nuestro estudio. Igualmente, cuando analizamos únicamente los aislamientos con un halo de 6 mm con el disco de oxacilina, la prueba tuvo una sensibilidad de 100% para detectar la alta resistencia a penicilina y adicionalmente captar todos los aislamientos resistentes a ceftriaxona. Estos datos son similares a los encontrados en otros grupos de trabajo (4, M. Lovgren, NCS Canadá, comunicación personal).

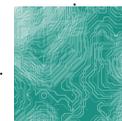
Con los resultados obtenidos se confirma la importancia de realizar en todos los aislamientos invasores de *S. pneumoniae*, la prueba tamiz de oxacilina, como parte de los estudios de identificación del microorganismo, esta prueba debe seguir los parámetros y las recomendaciones de la NCCLS. Esta información oportuna permitirá aportar datos indispensables para el establecimiento de un tratamiento antimicrobiano adecuado y así mejorar el pronóstico del paciente y disminuir tanto la mortalidad como la morbilidad ocasionadas por este agente etiológico. **b**

Abstract

Introduction: The diffusion method with a 1 µg oxacillin disk is currently recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) as an effective screening test for the detection of *Streptococcus pneumoniae* diminished susceptibility to penicillin, and is widely used by clinical laboratories. The results also apply to third generation cephalosporins. However, the degree of resistance should be established by a quantitative procedure as the minimal inhibitory concentration (MIC).

Objective: To establish the relation between the absence of a growth inhibition zone (6mm reading, diameter of the disk), and the susceptibility of *S. pneumoniae* to penicillin and ceftriaxone. **Materials and Methods:** The inhibition zones obtained by the diffusion method with 1 µg oxacillin disk were compared with penicillin and ceftriaxone MICs from 586 *S. pneumoniae* invasive isolates. Susceptibility methods were performed and interpreted according to the NCCLS guidelines. **Results:** Among the 586 isolates, 99 (16,7%) presented an inhibition halo of 6 mm, 15 (15.2%) of which showed intermediate level resistance (ILR) to penicillin (MICs 0.125 -1.0 µg/mL) and 84 (84.8%), high level resistance (HLR) (MIC ≥ 2.0 µg/mL). Regarding ceftriaxone, 20/99 (20.2%) isolates were sensible (MIC ≤ 0.5 µg/mL), 51 (51.5%) showed ILR (MIC = 1.0 µg/mL), and 28 (28.3%) HLR (MIC ≥ 2.0 µg/mL).

Conclusions: The absence of a growth inhibition zone (6 mm reading, diameter of the disk) could be used as an indicator of HLR to penicillin (sensitivity 100% and specificity 81.7%) and, additionally, it could predict ILR or HLR to ceftriaxone. This data is very important to guide the therapeutic decision before a MIC can be established. **Key words:** *Streptococcus pneumoniae*, oxacillin, minimal inhibitory concentration, penicillin, ceftriaxone.



Referencias

1. **Kristinsson KJ.** Effect of antimicrobial use and other risk factors on antimicrobial resistance in Pneumococci. *Microb Drug Resist* 1997; 3: 117-23.
2. **Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Pérez A, Sasal J. Evolution.** Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: Update (1990 to 1996). *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3447-54.
3. **Castañeda E, Peñuela I, Vela MC.** Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Colombia: Presence of international epidemic clones. *Microb Drug Resist* 1998; 4: 233-239.
4. **Butler JC, Hofmann JO, Cetron MS, Elliot JA, Facklam RR, Breiman RF, et al.** The continued emergence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States: An update from the Centers for Disease Control and Prevention's Pneumococcal sentinel surveillance system. *J Infect Dis* 1996; 174:986-93.
5. **Jacobs MR.** Treatment and diagnosis of infections caused by drug resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 1992; 15:119-27.
6. **Jetté LP, Sinave C.** Use of oxacilin disk screening test for detection of penicillin and ceftriaxone-resistant pneumococci. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1178-81.
7. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2000. Disk diffusion. Supplemental tables. M100-S10 (M2). Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
8. **Barry AL, Fuchs PC.** Methods for predicting susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to cefixime. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1031-33.
9. **Friedland IR, Shelton S, McCracken GH Jr.** Screening for cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* with the Kirby-Bauer susceptibility test. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1619-21.
10. **Barry AL, Fuchs PC.** Surrogate disk for predicting cefotaxime and ceftriaxone susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2609-12.
11. **Castañeda E, Leal AL, Castillo O, De la Hoz F, Vela MC, Arango M, et al., and the Pneumococcal Study Group in Colombia.** Distribution of capsular types and antimicrobial susceptibility of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Colombian children. *Microb Drug Resist* 1997; 3: 147-52.
12. **Agudelo CI, Sanabria OM, Ovalle MV, Castañeda E,** Grupo Colombiano de Trabajo en *Streptococcus pneumoniae*. Vigilancia por el laboratorio de *Streptococcus pneumoniae*, aislado de procesos invasores en niños menores de 5 años. Actualización de los datos 1994 –1999. *IQEN* 2000; 5: 131-5.
13. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2000. MIC testing. Supplemental tables. M100-S10 (M72). Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
14. **Dean AG, Dean AJ, Columbier D, Burton AH, Brendel KA.** Epi Info versión 6.0: a word processing, data-base and statistics program for epidemiology on microcomputers. Atlanta, Georgia: Centers for Disease Control and Prevention; 1994.
15. **Heffelfinger JD, Dowell SF, Jorgensen JH, Klugman KP, Mabry LR, Musher DM, et al.** Management of community-acquired pneumonia in the era of pneumococcal resistance. *Arch Intern Med* 2000; 160: 1399-1408.
16. **Chandy CJ.** Treatment failure with use of third-generation cephalosporin for penicillin-resistant pneumococcal meningitis: case report and review. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 188-93.
17. **Hsueh P, Teng LJ, Lee L, Yang P, Ho SW, Luh KT.** Dissemination of high-level penicillin, extended spectrum cephalosporin and erythromycin resistant *Streptococcus pneumoniae* clones in Taiwan. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 221-24.