

**DETERMINACION DE LA CARGA CRITICA
COMO NUEVO METODO ALTERNATIVO AL
ESTANDAR DE DIFUSIÓN EN AGAR PARA
ESTABLECER LA SENSIBILIDAD Y
RESISTENCIA A LOS AGENTES
ANTIMICROBIANOS**

Khalil Y. R. Abujheisha

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**DETERMINACION DE LA CARGA CRITICA COMO NUEVO
METODO ALTERNATIVO AL ESTANDAR DE DIFUSIÓN EN
AGAR PARA ESTABLECER LA SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA
A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS**

Memoria presentada por D. Khalil Y. R. Abujheisha para aspirar al Grado de Doctor
en Microbiología

El Doctorando,

Fdo.: Khalil Abujheisha

Los Directores,

Fdo.: Alfonso Ruiz-Bravo López
Catedrático de Microbiología
Universidad de Granada

Fdo.: Antonio Martínez Brocal
Adjunto de Microbiología
Hospital Universitario Virgen
de las Nieves

Fdo.: Manuel de la Rosa Fraile
Jefe del Servicio de Microbiología
Hospital Universitario Virgen de las Nieves

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5.
1.1. CONCEPTOS GENERALES Y DESARROLLO DE LOS AGENTES ANTIBACTERIANOS.....	10.
1.2. PRINCIPALES FAMILIAS DE AGENTES ANTIBACTERIANOS Y SUS MECANISMOS DE ACCIÓN.....	19.
1.3. RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIBACTERIANOS.....	31.
1.4. METODOS DE LABORATORIO PARA DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.....	39.
1.5. ANTIBIOGRAMA- SIGNIFICACIÓN Y INTERPRETACION.....	65.
1.6. TEORÍA DE LA FORMACIÓN DE HALO Y CONCEPTO DE CONCENTRACIÓN CRÍTICA.....	77.
2. OBJETIVOS.....	81.
3. MATERIAL Y METODOS.....	84.
3.1. BACTERIAS.....	85.
3.2. MEDIOS DE CULTIVO.....	88.
3.3. ANTIBIÓTICOS.....	99.
3.4. DETERMINACIÓN DE CMI POR DILUCIÓN EN AGAR.....	90.
3.5. E-TEST.....	94.
3.6. SISTEMA WIDER.....	96.
3.7. DETERMINACIÓN DE LA CARGA CRITICA (CM0).....	97.
3.8. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE CORTE PARA CARGA CRITICA.....	100.
3.9. EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA PROPUESTA.....	101.
4. RESULTADOS.....	103.
4.1. DETERMINACIONES DE CMI PARA GENTAMICINA.....	104.
4.2. DETERMINACIONES DE CARGA CRITICA (CM0) PARA GENTAMICINA.....	108.
4.3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DETERMINACIÓN DE LOS	

VALORES DE CORTE PARA CARGA CRITICA DE GENTAMICINA.....	111.
4.4. DETERMINACIONES DE CMI PARA CIPROFLOXACINO.....	124.
4.5. DETERMINACIONES DE CARGA CRITICA (CM0) PARA CIPROFLOXACINO.....	128.
4.6. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE CORTE PARA CARGA CRITICA DE CIPROFLOXACINO.....	131.
4.7. VALIDACIÓN DE LOS VALORES DE CORTE PARA CM0 DE GENTAMICINA.....	142.
4.8. VALIDACIÓN DE LOS VALORES DE CORTE PARA CM0 DE CIPROFLOXACINO.....	151.
5. DISCUSIÓN.....	160.
6. CONCLUSIONES.....	168.
7. BIBLIOGRAFÍA.....	171.

1. INTRODUCCION

Según sugiere el estudio de los microfósiles más antiguos, la historia evolutiva y la diversificación de los procariotas sobre la Tierra data de hace casi cuatro mil millones de años. Los primeros organismos pluricelulares tienen una antigüedad inferior a mil millones de años, y los vertebrados aparecieron en el periodo Paleozoico, hace poco más de quinientos millones de años. La emergencia de estos nuevos niveles de organización biológica ofreció nuevos nichos ecológicos que las bacterias se apresuraron a colonizar. La adaptación de diversos microorganismos a las condiciones ambientales ofrecidas por los animales determina el establecimiento de comunidades microbianas estables en los distintos nichos posibles (piel y mucosas), constituyendo las denominadas “microbiotas” o conjuntos de microorganismos autóctonos. La característica definitoria de estas comunidades es su interacción mutualista con el organismo hospedador. Un ejemplo bien conocido de tales interacciones lo constituye la microbiota intestinal: estudios comparativos entre animales convencionales, animales axénicos (extraídos por cesárea y mantenidos en condiciones estériles) y animales gnotobióticos (animales originalmente axénicos, en los que se ha establecido una microbiota intestinal constituida por microorganismos conocidos) han mostrado que algunas de las bacterias indígenas ejercen efectos cruciales para el desarrollo y maduración del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT, siglas de “gut-associated lymphoid tissue”), además de contribuir a la maduración del propio epitelio

intestinal y de ocupar posibles lugares de asentamiento de bacterias enteropatógenas [Falk *et al.*, 1998; Umesaki y Setoyama, 2000].

Pero las interacciones entre microorganismos y hospedador pueden arrojar un balance desfavorable para este último. Los microorganismos patógenos se definen como aquellos capaces de causar enfermedades en el hospedador. La patología infecciosa ocurre como consecuencia del acceso de un microorganismo patógeno (o de sus toxinas) al medio interno del hospedador, y a ella suelen contribuir, en mayor o menor grado, la acción directa del agente patógeno y la respuesta defensiva del hospedador, ya que, tanto los mecanismos de la inmunidad innata como los de la específica, tienen frecuentemente consecuencias deletéreas para los tejidos del hospedador. La plasticidad genética de las bacterias, sustentada en la mutación y en la incorporación y recombinación de DNA, ha moldeado la evolución de la constelación de bacterias patógenas asociada a cada especie animal viviente [Fiel y Spratt, 2001]; a su vez, la presión ejercida por los microorganismos patógenos ha dejado su impronta en la evolución de los mecanismos defensivos que integran el sistema inmune del hospedador [Hughes, 2002].

Entre las muchas propuestas teóricas concernientes a la interacción patógeno-hospedador, una de las generalmente aceptadas establece que un microorganismo patógeno bien adaptado a una especie hospedadora debe causar una infección de larga duración y que afecte poco a la vitalidad del organismo infectado, ya que esta situación proporciona al agente patógeno más oportunidades para la transmisión a otros miembros de la especie hospedadora. Según este postulado, los microorganismos patógenos adaptados a una especie, que accidentalmente infecten a un individuo de otra especie susceptible, causarán en esta una patología más grave; algo similar debiera ocurrir con los patógenos evolutivamente más recientes. Ciertamente, podemos encontrar ejemplos concretos, tanto a favor como en contra. Pero, en cualquier caso, lo cierto es que la coexistencia evolutiva de una especie animal con sus correspondientes microorganismos patógenos es una historia cruenta: no solo perecen frecuentemente individuos menos favorecidos genéticamente para la resistencia, sino que en situaciones de compromiso, como las derivadas de la presencia de heridas, o del deterioro de las defensas por otras patologías previas o por la edad, el final suele ser consecuencia de un proceso infeccioso. La historia de la Humanidad no ha sido una excepción a esta ley.

Hasta el s. XIX, el desconocimiento del origen microbiano de las enfermedades transmisibles impidió cualquier estrategia efectiva frente a ellas. La Microbiología nace, como ciencia experimental, de la mano de Pasteur, y, entre finales del s. XIX y principios del XX, se identifican los microorganismos responsables de la mayoría de las enfermedades infecciosas y se establecen las bases de algunas maneras de prevenirlas, mediante el desarrollo de la higiene y las vacunas. Pero, a partir de la década de los 30, comienza a hacerse posible una nueva opción: la de influir decisivamente en el curso de un proceso infeccioso ya establecido, mediante la administración al hospedador de fármacos capaces de inhibir la proliferación de los microorganismos e, incluso, de destruirlos. **Walsh [2003]** reconoce la existencia, ya desde estos primeros años de la era de los agentes antimicrobianos, de una dicotomía en los programas encaminados a encontrar nuevos fármacos utilizables en la terapéutica de las enfermedades infecciosas: por una parte, el desarrollo de moléculas de síntesis química, la aplicación del concepto de “balas mágicas”, elaborado por Ehrlich a principios del siglo, y llevado a la realidad con la introducción de las sulfamidias; por otra, la posibilidad de sacar partido del concepto de antibiosis (debido a Vuillemin, en 1889), y utilizar como fármacos productos microbianos capaces de inhibir o destruir a bacterias patógenas.

El sucesivo descubrimiento y aplicación farmacológica de nuevos agentes antimicrobianos trajo consigo la sensación de que el ser humano había triunfado de una manera definitiva en su lucha secular contra las enfermedades infecciosas: el enemigo había sido descubierto y disponíamos, por fin, de fármacos notablemente eficaces para unos u otros grupos de microorganismos patógenos. Sin embargo, la anteriormente mencionada capacidad de las bacterias para la variación genética entró en juego, demostrando que la respuesta a los nuevos factores de presión selectiva introducidos por el hombre no necesitaba millares de años para aparecer, sino que bastaban unos pocos meses. La emergencia de bacterias resistentes ha seguido de cerca a la introducción de cada nuevo fármaco antimicrobiano, y constituye en la actualidad uno de los mayores desafíos que ha de afrontar la Humanidad [**Jiménez-Valera *et al.*, 2003**]. Consideradas en conjunto, las enfermedades transmisibles, producidas por virus, bacterias y parásitos, persisten entre las primeras causa de fallecimiento a nivel mundial, como se desprende de las estadísticas recopiladas por la OMS (en la evaluación para 2002, publicada en 2004, las enfermedades infecciosas figuraron como segunda causa de mortalidad, detrás

de las cardiovasculares). La búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, que deberá beneficiarse tanto de las amplísimas “bibliotecas farmacoquímicas” desarrolladas en base a la llamada “química combinatoria”, como del diseño racional de moléculas capaces de inhibir las nuevas “dianas” microbianas reveladas por la exploración de los numerosos genomas secuenciados, y el uso racional y prudente de los que actualmente poseemos, son los principales pilares en que se debe basar la respuesta al desafío que plantean los microorganismos patógenos y la emergencia de resistencias [**Jiménez-Valera *et al.*, 2003**].

1.1. CONCEPTOS GENERALES Y DESARROLLO DE LOS AGENTES ANTIBACTERIANOS.

1.1.1. Terminología.

Existe un cierto confusionismo en el uso de los distintos términos que designan a las sustancias con actividad antimicrobiana. El término más amplio sería el de “agente antimicrobiano”, definido como cualquier sustancia capaz de matar microorganismos (acción microbicida) o inhibir su desarrollo (acción microbiostática) [**Prescott *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2004**]. El término antimicrobiano incluye agentes con actividad antibacteriana, antiparasitaria, antifúngica y antiviral. Son agentes antimicrobianos los antisépticos y desinfectantes, también denominados “germicidas” [**Ingraham e Ingraham, 1998**], que se usan para destruir microorganismos en la superficie corporal y de objetos, pero nunca se introducen en el medio interno, por su toxicidad (aunque algunos, con escaso poder de penetración tisular, pueden utilizarse para desinfectar heridas). Igualmente, son agentes antimicrobianos los fármacos que se administran, por vía oral o parenteral, para alcanzar en los tejidos concentraciones capaces de inhibir a los microorganismos.

Etimológicamente, el término “agente quimioterápico” significaría cualquier sustancia que se administra para tratar una enfermedad. Este sentido amplio incluiría a todos los fármacos. Sin embargo, usualmente el sentido de quimioterápico se restringe a los agentes químicos que se usan para tratar enfermedades infecciosas o neoplásicas, por su toxicidad selectiva, sensiblemente mayor para los microorganismos o la células tumorales, respectivamente, que para las células sanas. En microbiología, es frecuente denominar quimioterápicos a los agentes antimicrobianos obtenidos por síntesis química, por contraposición a los antibióticos, que serían los agentes antimicrobianos producidos por microorganismos. Sin embargo, no siempre se mantiene esta distinción, y los autores anglosajones suelen utilizar el término antibiótico como sinónimo de antibacteriano, independientemente de su origen, y así hablan de “*natural antibiotics*” y de “*man-made, synthetic antibiotics*” [Walsh, 2003]. El hecho de que algunos antibióticos, originalmente producidos por microorganismos, se hayan obtenido luego como productos semisintéticos (por modificaciones químicas del metabolito original), como es el caso de las penicilinas semisintéticas, o como productos totalmente sintéticos, como ocurrió con el cloranfenicol, contribuye a la confusión entre los distintos términos. También hay que considerar que algunas bacterias producen proteínas con actividad antibacteriana, llamadas bacteriocinas, que, en principio, reúnen los requisitos para figurar en el concepto de antibiótico. De hecho, la definición clásica que describe los antibióticos como moléculas no proteicas, de bajo peso molecular, producidas como metabolitos secundarios, principalmente por los microorganismos que viven en el suelo [Salyers y Whitt, 2002], tiende a ser ampliada para incluir a los antibióticos peptídicos, tanto a los que no son sintetizados en ribosomas (bacitracina, polimixina, gramicidina), como a los que sí lo son (bacteriocinas modificadas post-traslacionalmente o lantibióticos, y bacteriocinas no modificadas) [Walsh, 2003; Puertollano *et al.*, 2003].

En esta Memoria de Tesis Doctoral, en adelante, utilizaremos indistintamente los términos “agente antimicrobiano”, “antibiótico” y “agente antibacteriano”, puesto que sólo nos ocuparemos de estos últimos.

1.1.2. El inicio de la “era de los antibióticos”.

La llamada “era de los antibióticos” nació del trabajo de Paul Ehrlich, cuya búsqueda de las "balas mágicas" con afinidad selectiva por los microorganismos culminó con la curación, mediante arsenobenzol, de conejos experimentalmente infectados con sífilis, lo que fué comunicado en 1910.

El trabajo de Alexander Fleming con la penicilina se inició en 1928. Su biógrafo Gwyn MacFarlane señala que Fleming, que trabajaba, bajo la dirección de Almroth Wright, en el “Departamento de Inoculación” del *St. Mary's Hospital*, era considerado una autoridad en estafilococos y había sido invitado a colaborar con un trabajo sobre estas en un libro sobre bacteriología sistemática [MacFarlane, 1985]. La observación accidental de un fenómeno de antibiosis entre un hongo contaminante y las colonias de estafilococos en una placa previamente desechada, a primeros de septiembre de 1928, atrajo su atención; a juzgar por sus esfuerzos en conservar la placa, debidamente fijada con formalina, percibió con claridad que podía ser un descubrimiento de gran trascendencia. Algo más de un mes después, comienzan a registrarse, en su cuaderno de laboratorio, los resultados de sus primeros experimentos con el hongo. A partir de la clasificación errónea del hongo como *Penicillium rubrum* por un micólogo (posteriormente se estableció que era *Penicillium notatum*), Fleming acuñó el término “penicilina” para designar al filtrado de caldo de cultivo con actividad antibacteriana. En 1929, Fleming publicó sus datos sobre la actividad de la penicilina en el *British Journal of Experimental Pathology*, resaltando su atoxicidad, lo que le llevó a considerar sus posibles aplicaciones como antiséptico local, aunque las sugerencias finales recomendaban su utilización para convertir en selectivos medios de cultivo destinados al aislamiento de bacterias resistentes, como el bacilo al que se atribuía la etiología de la gripe (posteriormente denominado *Haemophilus influenzae*).

No deja de ser interesante constatar que la presencia de actividad antibacteriana en hongos había sido observada varias veces antes de los hallazgos de Fleming. En 1872, el cirujano inglés Joseph Lister utilizó cultivos de hongos del género *Penicillium* en el tratamiento antiséptico de heridas, al parecer con algún éxito; y, en 1928, Papacostas y Gaté publicaron en Francia un libro que recogía bastantes observaciones sobre antibiosis, en muchos casos debida a hongos. Quizás el hecho de que estas

investigaciones no alcanzasen ninguna relevancia práctica contribuyó a que el artículo de Fleming no suscitara especial interés, aunque en los años siguientes algunos científicos le pidieron muestras del hongo y trabajaron sobre la penicilina, y el propio Fleming insistió en intentos de aplicación como antiséptico local. Pero las dificultades para obtener cantidades suficientes del producto debidamente purificado limitaron estas investigaciones.

En el intervalo hasta la II Guerra Mundial, el sueño de Ehrlich pareció materializarse de la mano de Gerhard Domagk, con la introducción de las sulfanilamidas como medicamentos eficaces frente a un número de infecciones bacterianas hasta entonces imposibles de controlar. El primero de estos poderosos agentes fué el prontosil, comercializado en 1935. El éxito de Domagk se debió a que realizó sus ensayos *in vivo*, en animales infectados experimentalmente, ya que el prontosil no es activo *in vitro*: en el medio interno, el compuesto se descompone liberando la sulfonamida con actividad antibacteriana. En 1936, el médico inglés Colebrook demostró la eficacia del prontosil en el tratamiento de la fiebre puerperal, aunque el hecho de tratar todos sus casos, sin establecer un grupo control (por obvias razones deontológicas) le valió algunas críticas formales.

En 1938, el australiano Howard Florey, catedrático de patología en Oxford, y su colaborador Ernst Boris Chain, que habían realizado investigaciones con la lisozima (y que, por este motivo, conocían la obra de Fleming sobre este enzima y mantenían contacto con él), incluyeron la penicilina en su programa de investigación sobre agentes antibacterianos. Dos años más tarde, publicaron, junto con otros colaboradores, un trabajo en *The Lancet* sobre la eficacia de la penicilina en el tratamiento de infecciones experimentales en el ratón. Limitados siempre por la escasez con se obtenía el producto, el equipo de Florey, con la incorporación de un clínico, Charles Fletcher, iniciaron en 1941 los ensayos en humanos. En los seis primeros casos tratados, enfermos de infecciones muy graves, la penicilina mostró una asombrosa eficacia, si bien se registraron dos muertes, la primera por una recaída que no pudo ser tratada por no disponer de más producto, y la segunda por una hemorragia secuela de la infección ya curada [MacFarlane, 1985]. La importancia de estos y posteriores resultados, especialmente en la terrible situación creada por la guerra, determinó la implicación de

firmas comerciales estadounidenses en la fabricación de grandes cantidades de penicilina y la accesibilidad de su utilización terapéutica.

El término "antibiótico" fué propuesto en 1941 por Selman Waksman para designar a los compuestos antimicrobianos producidos por microorganismos; tres años después, Waksman culminaba una trayectoria de investigación sobre antibióticos con el descubrimiento de la estreptomicina, que a su actividad frente a diversas bacterias Gram-negativas unía la virtud de ser el primer agente antituberculoso eficaz. En años sucesivos, el arsenal antimicrobiano continuó enriqueciéndose: tetraciclinas en 1945, cloranfenicol en 1947, cefalosporinas en 1948, neomicina en 1949. La importancia de la investigación pionera sobre agentes antimicrobianos fue reconocida con los premios Nobel, concedidos, en 1939 a Domagk (recogido en 1947), en 1945 a Florey, Chain y Fleming, y en 1952 a Waksman [**Beck, 2000**].

1.1.3. Características de los antibióticos.

La característica más importante de un agente antimicrobiano, especialmente desde el punto de vista clínico, es su toxicidad selectiva, es decir, que el agente antimicrobiano actúe de manera que inhiba o mate los patógenos bacterianos pero sin efecto tóxico en el paciente tratado. Obviamente, la toxicidad selectiva nunca es una propiedad absoluta, sino que depende de la dosis del antibiótico. Es, por tanto, un caso particular del concepto de "margen terapéutico", con la peculiaridad de que tanto las dosis terapéuticas como las tóxicas pueden compartir la propiedad de inhibir funciones biológicas, pero en organismos distintos, procariota (bacterias patógenas) y eucariota (células humanas), respectivamente.

Pero los efectos colaterales de los antibióticos no se refieren solo al concepto de toxicidad selectiva. La penicilina es un antibiótico con mínima toxicidad para el ser humano, ya que su mecanismo de acción se dirige contra dianas implicadas en la síntesis de la mureína, que no existen en nuestras células. Sin embargo, en algunos individuos, la penicilina puede causar reacciones alérgicas: en este caso, la posibilidad de inducir trastornos inmunopatológicos (reacciones de hipersensibilidad) es un efecto colateral indeseable de un antibiótico, no relacionado con su mecanismo de acción antibacteriana [**Ingraham e Ingraham, 1998**].

Un antibiótico clínicamente útil debe reunir las siguientes características:

- Debe tener una amplia gama de actividad con capacidad de destruir o inhibir diversas especies de organismos patógenos.
- No debe ser tóxico para el paciente y debe carecer de efectos secundarios indeseables.
- No debe producir alergia en el enfermo.
- No debe eliminar la microbiota del enfermo.
- Debe poder alcanzar la parte del cuerpo humano donde está ocurriendo la infección.
- Debe ser químicamente estable.

1.1.4. Clasificación de los antibióticos.

Los antibióticos pueden agruparse según diferentes criterios. Si se considera el tipo de efecto antibacteriano, se establecen dos grandes grupos: antibióticos bactericidas, los que, a dosis terapéuticas, matan a las bacterias susceptibles, y antibióticos bacteriostáticos, los que inhiben su capacidad de proliferación. Penicilinas y cefalosporinas, estreptomycin y demás miembros de su familia, ciprofloxacina y otras quinolonas, son ejemplos de antibióticos bactericidas; tetraciclinas, eritromicina y otros macrólidos, cloranfenicol, lo son de antibióticos bacteriostáticos.

La determinación de las actividades bactericida y bacteriostática en el laboratorio se realiza mediante técnicas en las que se ensayan los efectos de diluciones sucesivas del antibiótico sobre cultivos de bacterias, como se explicará más adelante. Esto permite establecer dos medidas, designadas con las siglas CMB (“concentración mínima bactericida”), que se define como la menor concentración de antibiótico que mata al 99.9% de las bacterias presentes en un inóculo debidamente estandarizado, y CMI (“concentración mínima inhibidora”), que es la menor concentración del antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de dicho inóculo. Aquellos antibióticos cuyos valores de CMB y CMI están próximos ($CMB \leq 4 \times CMI$) se clasifican como bactericidas, mientras aquellos otros con valores de CMB muy altos (generalmente, excesivos para ser usados en clínica) se consideran bacteriostáticos [Prescott *et al.*, 1999].

Otro criterio interesante se basa en el espectro de actividad del antibiótico, es decir, la diversidad de especies bacterianas frente a las que es activo. Los antibióticos denominados de amplio espectro son activos frente a un gran número de especies bacterianas patógenas, pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos, incluyendo bacterias Gram-positivas y Gram-negativas; los antibióticos de espectro reducido son activos sobre grupos más reducidos de bacterias Gram-positivas o Gram-negativas [Prescott *et al.*, 1999]. Algunos autores incluyen una tercera categoría, de antibióticos de espectro limitado a una especie bacteriana o unas pocas especies relacionadas.

Una clasificación más minuciosa agrupa a los antibióticos en familias según su estructura química: β -lactámicos, glucopéptidos, aminoglicósidos, tetraciclinas, quinolonas, macrólidos, ketólidos, estreptograminas, oxazolidinonas, etc.

Finalmente, los antibióticos pueden clasificarse según el mecanismo de acción y las dianas afectadas en la bacteria [Figura 1]. Según este criterio, hay antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas, de la pared celular, afectando la integridad de las membranas, etc.

Dado que los antibióticos miembros de una misma familia suelen compartir mecanismos de acción, es posible combinar los dos últimos criterios, elaborando una clasificación por mecanismos de acción y presentando dentro de cada mecanismo las distintas familias que lo poseen. Una clasificación basada en ambos criterios se presenta en la **Tabla 1**.

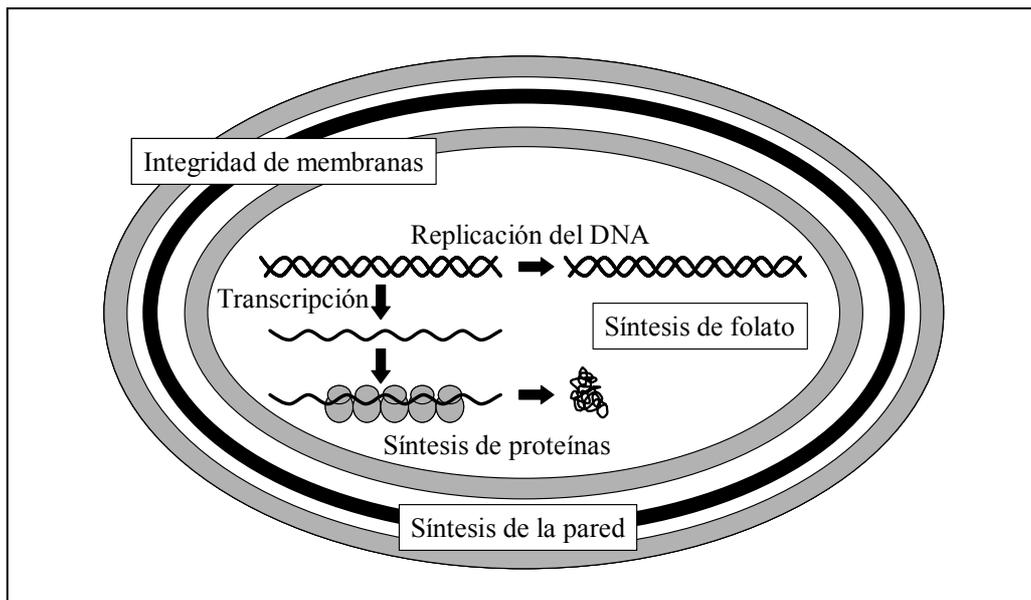


Figura 1. Dianas para los agentes antibacterianos. Se representa esquemáticamente la estructura de una bacteria Gram-negativa y se incluyen las principales funciones que pueden ser inhibidas por diversos antibióticos.

Tabla 1. Mecanismos de acción de las principales familias de antibióticos.						
Mecanismo	Dianas	Familia	Ejemplos			
Inhibición de la síntesis de peptidoglicano y estímulo de autolisinas	PBP's	Beta-lactámicos	Penicilinas	Penicilina G		
				Amoxicilina		
				Meticilina		
				Carbencilina		
				Cefalosporinas	Cefalotina	
				Ceftriaxona		
				Cefepima		
				Carbapenemas	Imipenem	
				Monobactamas	Aztreonam	
Inhibición de la síntesis de peptidoglicano	D-Ala-D-Ala	Glicopéptidos	Vancomicina			
			Teicoplanina			
	Piruvil-transferasa	Fosfomicina	Fosfomicina			
	C ₅₅ -undecaprenol-fosfato	Peptídicos	Bacitracina			
Daño en membranas	LPS y fosfolípidos	Peptídicos	Polimixinas			
Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos	InhA	Isoniazida	Isoniazida			

Tabla 1. (Continuación)					
Mecanismo	Dianas	Familia	Ejemplos		
Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad ribosomal 30S	Aminoglicósidos	Estreptomina		
			Gentamicina		
			Kanamicina		
		Tetraciclinas	Doxiciclina		
			Minociclina		
	Subunidad ribosomal 50S	Macrólidos	Eritromicina		
			Claritromicina		
			Azitromicina		
		Ketólidos	Telitromicina		
			Oxazolidinonas	Linezolid	
Estreptograminas	Quinupristina/ dalfopristina				
	Lincosamidas	Lincosamina			
		Clindamicina			
Antimetabolitos del fólico	Dihidropteroato sintasa	Sulfonamidas	Sulfametoxazol		
	Dihidrofolato reductasa		Trimetoprima		
Inhibición de la transcripción	RNA polimerasa	Ansamicinas	Rifampicina		
Inhibición de la síntesis de DNA	DNA girasa (Gram-) y topoisomerasa IV (Gram+)	Quinolonas	1ª generación	Nalidixico	
			Fluorquinolonas	Ciprofloxacina	
		Sparfloxacina			
		Moxifloxacina			
		Desfluorquinolonas	Garenoxacina		

1.2. PRINCIPALES FAMILIAS DE AGENTES ANTIBACTERIANOS Y SUS MECANISMOS DE ACCIÓN.

Con el fin de no reiterar las citas en los distintos epígrafes, se indica aquí que la mayor parte de la información concerniente a este apartado se ha tomado de **Prescott [1999]**, **Walsh [2003]** y **Yao y Moellering [2003]**.

1.2.1. Beta-lactámicos.

La denominación antibióticos β -lactámicos designa un amplio grupo de moléculas que comparten, desde el punto de vista estructural, la presencia del anillo β -lactámico, y en cuanto a mecanismos de acción, la capacidad de unirse a proteínas de la pared celular, llamadas PBPs (de “penicillin-binding proteins”) e inhibir la reacción de transpeptidación. La transpeptidación permite a las subunidades de N-acetilglucosamina-N-acetilmuramil-pentapéptido incorporarse a la cadena naciente de peptidoglicano, a costa de perder una D-Ala terminal. Dentro de este grupo de antibióticos, se reconocen hasta cinco familias: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas y clavamas.

Las penicilinas se caracterizan porque el anillo β -lactámico está fusionado con un anillo tiazolidínico. Esta estructura la producen, como metabolito secundario, diversos hongos, especialmente *Penicillium chrysogenum*. Se trata de un grupo de antibióticos, naturales y semisintéticos, capaces de actuar como falsos sustratos para las transpeptidasas y llevarlas a iniciar un ciclo catalítico equivocado, de consecuencias letales para la bacteria. La introducción de modificaciones en la cadena lateral unida, mediante un enlace amido, al anillo β -lactámico, aporta distintas propiedades al antibiótico, pudiéndose establecer, en base a ello, una agrupación en cinco categorías. La primera comprende bencilpenicilina y fenoximetilpenicilina (penicilinas G y V, respectivamente), y, aunque se las clasifica como de espectro reducido, son activas frente a bacterias Gram-positivas, aerobias (estafilococos, estreptococos) y anaerobias (*Clostridium* spp.), frente a cocos Gram-negativos (*Neisseria* spp.), bacilos Gram-negativos anaerobios (*Fusobacterium* spp.), treponemas y otros patógenos; sin embargo, su eficacia está limitada por su sensibilidad a β -lactamasas (enzimas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico). En la segunda categoría figuran meticilina y oxacilina, que, debido a la presencia de voluminosos grupos en la cadena lateral, son especialmente activas frente a estafilococos productores de penicilinas (β -lactamasa que inactiva penicilinas). La tercera categoría es la de penicilinas de amplio espectro, como la ampicilina y la amoxicilina, que añaden, al espectro de la 1ª categoría, otras bacterias Gram-positivas como enterococos y *Listeria monocytogenes*, y Gram-negativas como enterobacterias, entre ellas *Salmonella enterica* (incluyendo el serovar Typhi) y *Shigella* spp.; sin embargo, se trata de moléculas sensibles a penicilinasas. En la cuarta categoría se encuentran penicilinas (carboxipenicilinas) que, aunque son degradadas por la penicilinasas estafilocócica, resisten a la hidrólisis por β -lactamasas de bacterias Gram-negativas, por lo que se las considera de amplio espectro: carbenicilina y ticarcilina tienen buena actividad frente a numerosas enterobacterias (excepto *Klebsiella* spp.) y, por su capacidad adicional de penetrar a través de las porinas, muy restrictivas, de la membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa*, son también activas frente a esta bacteria. Finalmente, a la quinta categoría (ureidopenicilinas) se la califica de espectro extendido, por su actividad incrementada frente estafilococos, enterococos, enterobacterias (incluyendo muchas cepas de *Klebsiella* spp.), *P. aeruginosa* y bacterias anaerobias como *Bacteroides fragilis*; piperacilina, azlocilina y mezlocilina figuran en esta categoría.

El núcleo estructural de las cefalosporinas es el ácido 7-aminocefalosporánico, resultante de la fusión del anillo β -lactámico con un anillo dihidrotiazina de seis átomos, y producido por el hongo *Acremonium chrysogenum*. Como en el caso de las penicilinas, las modificaciones en la cadena lateral confiere a las cefalosporinas diferentes propiedades antibacterianas y farmacocinéticas, y en base a ellas estos antibióticos se agrupan en generaciones. En la primera de ellas figuran agentes como cefalotina y cefazolina, de espectro reducido, activos frente a bacterias Gram-positivas, con excepción de los estafilococos resistentes a meticilina (conocidos con las siglas MRSA, de *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) y los enterococos, y frente algunas bacterias Gram-negativas, como muchas cepas de *E. coli* y *Klebsiella* spp. La segunda generación comprende moléculas como cefamandol, cefoxitina, cefuroxima y cefaclor, que, por su estabilidad frente a β -lactamasas de bacterias Gram-negativas, su capacidad para penetrar a través de la membrana externa y su afinidad por PBPs, extienden su espectro a enterobacterias, *H. Influenzae* y *B. fragilis*. La cefoxitina pertenece al grupo de las cefamicinas, caracterizadas por un grupo metoxi unido al carbono 7 del anillo β -lactámico, que les confiere resistencia a numerosas β -lactamasas; su actividad frente a cocos Gram-positivos es menor que la de las moléculas de 1ª generación, pero el espectro se amplía frente a bacterias Gram-negativas y, especialmente, frente a anaerobias. La tercera generación, con antibióticos como cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima, se califica como de amplio espectro, con una actividad potente frente a enterobacterias y, en algunos casos, frente a *P. aeruginosa*. Finalmente, la cuarta generación, representada por cefepima, es estable frente a más β -lactamasas y tiene mayor potencia para bacterias Gram-negativas que los miembros de la generación anterior.

En las carbapenemas, el anillo β -lactámico está fusionado a un anillo de cinco miembros, pero que carece de azufre. Tanto imipenem como meropenem son antibióticos de amplio espectro (tienen afinidad por PBP 1 y PBP 2 de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas), resistentes a un gran número de β -lactamasas (excepto las metalo- β -lactamasas) y con buena biodisponibilidad por vía oral. Imipenem es inactivado por una dehidropeptidasa renal, por lo que debe administrarse asociado a cilastatina, que inhibe dicha enzima.

Las monobactamas se denominan así porque solo poseen un ciclo, que es el anillo β -lactámico. El aztreonam se une a la PBP-3 de bacterias Gram-negativas y a estos patógenos se restringe su espectro de acción, que incluye *P. aeruginosa*. Este antibiótico tiene una notable estabilidad frente a las β -lactamasas.

Finalmente, las clavamas poseen, fusionado con el anillo β -lactámico, un anillo de cinco miembros, que incluye, junto con el nitrógeno β -lactámico, un átomo de oxígeno. El ácido clavulánico tiene escasa afinidad por las PBPs, por lo que no se considera un antibiótico (aunque posee cierta actividad antibacteriana), pero es capaz de unirse irreversiblemente a β -lactamasas plasmídicas, por lo que se utiliza, como inhibidor de estas enzimas, en combinaciones sinérgicas con antibióticos como amoxicilina o ticarcilina.

El hecho de que estos antibióticos actúen sobre estructuras ausentes en las células de mamífero les confiere una excelente toxicidad selectiva. Los principales efectos adversos se refieren a la inducción de reacciones alérgicas. Ocasionalmente, pueden causar diarreas y otros trastornos, como hepatotoxicidad.

1.2.2. Glicopéptidos.

Vancomicina y teicoplanina son los miembros característicos de esta familia de moléculas de estructura compleja, consistente en un heptapéptido (con cinco aminoácidos aromáticos) glicosilado. Se trata de antibióticos bactericidas, cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis del peptidoglicano a nivel de la transpeptidación, por secuestro de la porción terminal (el dímero de D-Ala) del N-acetil-glucosamina-N-acetilmuramil-pentapéptido. No son capaces de atravesar las porinas de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, por lo que su espectro de acción se restringe a bacterias Gram-positivas, tanto aerobias como anaerobias, lo que incluye estafilococos resistentes a meticilina, enterococos, y especies de *Corynebacterium*, *Clostridium* (vancomicina es el antibiótico de elección para tratar la colitis pseudomembranosa por *Clostridium difficile*) y *Actinomyces*.

Ambos antibióticos pueden administrarse por las vías parenteral y oral, aunque en este último caso el efecto será solo a nivel intestinal, porque no son absorbibles. Entre los efectos colaterales adversos de la vancomicina, predominan la fiebre y la flebitis en el caso de administración intravenosa; más raramente, se han descrito casos de leucopenia y nefrotoxicidad. La teicoplanina suele ser mejor tolerada.

1.2.3. Fosfomicina.

La fosfomicina, producida por *Streptomyces wedmorensis*, es un derivado del ácido fosfónico, que inhibe la primera etapa de la síntesis del peptidoglicano, la conversión de UDP-N-acetil-glucosamina en UDP-N-acetil-murámico. Es un antibiótico bactericida de amplio espectro, activo frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Los efectos colaterales de la fosfomicina son escasos; se han descrito trastornos gastrointestinales moderados.

1.2.4. Polipéptidos.

Ya se han mencionado anteriormente varias familias de antibióticos cuyas estructuras están constituidas por aminoácidos, pero que no se forman en los ribosomas. La denominación de antibióticos polipeptídicos corresponde a un grupo heterogéneo de moléculas peptídicas cíclicas, que probablemente actúan, no sobre un substrato específico, sino insertándose en las membranas externa e interna de las bacterias Gram-negativas, lo que incrementa la permeabilidad y destruye la barrera osmótica, provocando la bacteriolisis. El ejemplo típico es la polimixina, cuyo espectro se reduce a algunas bacterias Gram-negativas, pero con una excelente actividad sobre *P. aeruginosa*.

La bacitracina es una excepción en cuanto al mecanismo de acción de estos antibióticos, ya que, además de sus efectos sobre las membranas bacterianas, también es capaz de inhibir selectivamente el reciclaje del C₅₅ undecaprenol pirofosfato, que es la molécula encargada de transportar las unidades de N-acetil-glucosamina-muramilo-

pentapéptido a través de la membrana citoplásmica, para su incorporación a la red de mureína. La bacitracina es activa, principalmente, frente a bacterias Gram-positivas.

Los antibióticos polipeptídicos pueden causar nefrotoxicidad. Las polimixinas puede causar manifestaciones de neurotoxicidad.

1.2.5. Aminoglicósidos.

La estructura de los aminoglicósidos contiene un anillo aminociclitol (ciclohexitol con restos amino) unido (por uniones glicosídicas) a dos o más azúcares (uno de los cuales, al menos, debe ser un aminoazúcar). Se trata de moléculas policatiónicas, que se unen a polianiones de la superficie bacteriana, como el LPS de las bacterias Gram-negativas, para penetrar por procesos de transporte activo. La acción bactericida de los aminoglicósidos se debe a su capacidad para unirse irreversiblemente a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis proteica. Dentro de este grupo figuran moléculas de origen natural (producidas por actinomicetos), como estreptomicina, neomicina, kanamicina, tobramicina y gentamicina; y productos semisintéticos, como la amikacina (derivada de la kanamicina). Son activos sobre bacterias Gram-negativas en condiciones aerobias y sobre algunas bacterias Gram-positivas, como *S. aureus* y micobacterias.

Nefrotoxicidad y ototoxicidad son los principales efectos colaterales adversos de este grupo de antibióticos.

1.2.6. Tetraciclinas y glicilciclinas.

Las tetraciclinas son poliketidos aromáticos (cuatro anillos condensados) producidos por actinomicetos. Estos agentes entran en las bacterias por un proceso de transporte activo, que consume energía, y una vez dentro se unen a la subunidad ribosomial 30 S, donde bloquean el acceso del aminoacil-tRNA al complejo mRNA-ribosoma, inhibiendo la síntesis de proteínas. Sus efectos son, en general, bacteriostáticos. Suelen agruparse, según sus parámetros farmacocinéticos, en tetraciclinas de vida media corta (< 9 h), como la propia tetraciclina, la clortetraciclina y la oxitetraciclina; de vida media intermedia (12 h), la demeclociclina; y de vida media

larga (> 15 h), como doxiciclina y minociclina. Las glicilciclinas son tetraciclinas semisintéticas que no son reconocidas por la proteína transportadora responsable del eflujo de las tetraciclinas clásicas, que es uno de los mecanismos de resistencia que han limitado, en los últimos años, su aplicación clínica; por tanto, glicilciclinas como la tigeciclina, tienen una buena actividad antimicrobiana frente a cocos Gram-positivos y bacilos Gram-negativos, incluyendo algunos especialmente resistentes como *Stenotrophomonas maltophilia*.

Las tetraciclinas pueden causar irritación intestinal, diarreas por desequilibrio en la microbiota intestinal (incluyendo colitis pseudomembranosa), enlentecimiento en el crecimiento óseo y decoloración dental.

1.2.7. Macrólidos.

La estructura química que caracteriza a los macrólidos es un anillo macrolactónico de 14 (eritromicina, claritromicina, roxitromicina), 15 (azitromicina) o 16 (espiromicina, josamicina) átomos de carbono, unido a dos azúcares. Esta estructura es un caso particular dentro de las moléculas conocidas como poliketidos, sintetizadas por actinomicetos y hongos mediante condensación de ácidos carboxílicos pequeños como el acético, siendo característica de ellas la presencia de múltiples grupos carbonilos o hidroxilos separados por un átomo de carbono. Los macrólidos son antimicrobianos de amplio espectro (especialmente azitromicina y claritromicina), de acción generalmente bacteriostática, aunque a dosis altas pueden ser bactericidas; actúan inhibiendo la síntesis proteica, porque se unen reversiblemente al componente 23S de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, bloqueando la translocación de la cadena polipeptídica naciente. Es interesante resaltar que los macrólidos son concentrados por los fagocitos, alcanzando concentraciones intracelulares entre 10 y 150 veces mayores que las extracelulares, según el agente de que se trate; esta acumulación intracelular es importante en lo que se refiere a la acción antimicrobiana sobre microorganismos intracelulares, pero también debe ser considerada como un componente principal de la capacidad de estos agentes para modificar la capacidad de respuesta de células implicadas en la inmunidad; en general, los agentes encuadrados en este grupo poseen notables propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias.

Los macrólidos pueden causar efectos colaterales graves, como irritación gastrointestinal, tromboflebitis (tras administración intravenosa), hepatotoxicidad y reacciones alérgicas.

1.2.8. Ketólidos.

Los ketólidos están muy relacionados estructuralmente con los macrólidos; de hecho, la telitromicina es un derivado semisintético de la eritromicina, con el mismo mecanismo de acción. Las modificaciones estructurales confieren a los ketólidos una mayor actividad sobre cocos Gram-positivos; además, no inducen el fenotipo MLS_β (resistencia a macrólido-lincosamida-estreptogramina B), que aparece como consecuencia de una modificación enzimática del rRNA 23S. Además de la telitromicina, se han desarrollado otros miembros de esta familia, como los fluoroketólidos y la cetromicina, con espectro extendido a bacterias gram-negativas.

En general, la telitromicina es bien tolerada, siendo sus principales efectos adversos diarrea, náuseas y otros trastornos gastrointestinales.

1.2.9. Oxazolidinonas.

El linezolid es una molécula sintética que contiene un anillo oxazolidinona. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas como consecuencia de su unión al sitio P en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. El espectro de acción del linezolid está restringido a bacterias Gram-positivas (incluyendo micobacterias, estafilococos resistentes a meticilina, enterococos resistentes a vancomicina, estreptococos resistentes a macrólidos), pero están en desarrollo nuevas moléculas, como ranbezolid, cuyo espectro se extendería a bacterias Gram-negativas anaerobias.

Como efectos colaterales indeseables del linezolid, se han descrito trastornos gastrointestinales y, tras administración prolongada, mielotoxicidad.

1.2.10. Lincosamidas

La estructura de los miembros de esta familia consiste en el aminoácido metilprolina unido por una amida a un aminoazúcar piranósico. Inhiben la síntesis de proteínas, como consecuencia de su capacidad para unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Lincomicina y clindamicina son antibióticos con espectro amplio, que comprende cocos Gram-positivos (con la notable excepción de los enterococos) y bacterias anaerobias, tanto Gram-positivas (*Clostridium* spp.) como Gram-negativas (*B. fragilis*, *Porphyromonas* spp.). Los anaerobios facultativos que constituyen la familia *Enterobacteriaceae* son resistentes.

La administración de clindamicina causa diarrea en un porcentaje significativo de enfermos, y el desequilibrio inducido en la microbiota intestinal puede facilitar la colonización extensiva por cepas toxicogénicas de *C. difficile*, lo que da lugar a una colitis pseudomembranosa.

1.2.11. Estreptograminas.

Las estreptograminas, también conocidas como virginiamicinas y pristinamicinas, constituyen una familia de antibióticos naturales (producidos por especies de los géneros *Streptomyces* y *Actinoplana*), cada uno de ellos consistente en una combinación sinérgica de dos componentes no relacionados estructuralmente: una peptidolactona cíclica (péptido no sintetizado en ribosomas), como la pristinamicina I, y una macrolactona poliinsaturada con una parte de origen peptídico (anillo oxazol) insertada en una lactona polikétida, de que es ejemplo la pristinamicina II_A. Ambos se unen a la subunidad ribosomial 50S. La unión de pristinamicina II_A detiene la síntesis de proteínas porque impide la formación del enlace peptídico, además de inducir un cambio conformacional en el ribosoma que incrementa la afinidad por la pristinamicina I; esta promueve que la cadena peptídica incompleta se desprenda de la subunidad 50S. Quinupristina y dalfopristina son derivados semisintéticos, respectivamente, de las pristinamicinas I y II_A, con mayor solubilidad que los productos naturales. La combinación quinupristina-dalfopristina es activa frente a bacterias Gram-positivas, incluyendo estafilococos resistentes a meticilina; *Streptococcus faecalis* suele ser

resistente, pero *Streptococcus faecium* es sensible (incluso las cepas resistentes a vancomicina).

Las estreptograminas pueden causar artralgias y mialgias, así como flebitis en el sitio de la inyección intravenosa.

1.2.12. Ansamicinas (rifamicinas).

La rifampicina es un derivado semisintético de la rifamicina B, producida por *Nocardia mediterránea*. Estructuralmente, consta de un naftaleno unido por dos puntos no adyacentes a una cadena alifática que, por tanto, se cierra formando un macrociclo. Esta molécula es un inhibidor de la RNA-polimerasa bacteriana que bloquea la transcripción en las células procariotas. Su espectro de actividad es amplio, destacando su actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*; también es eficaz en infecciones por *Legionella pneumophila*, *Brucella* spp., *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *S. aureus* (incluyendo cepas resistentes a meticilina) y bacterias anaerobias.

A pesar de su toxicidad selectiva, la rifampicina tiene efectos adversos, entre los que destacan trastornos gastrointestinales, mialgias, artralgias y reacciones de hipersensibilidad.

1.2.13. Sulfonamidas y trimetoprim.

Sulfonamidas y trimetoprim son moléculas sintéticas cuya actividad antibacteriana se basa en la capacidad para actuar como análogos estructurales de intermediarios de la ruta metabólica del ácido fólico, necesaria para la síntesis de las bases pirimidínicas que constituyen los ácidos nucleicos. El sulfametoxazol y otras moléculas relacionadas con la sulfanilamida son análogos del ácido *p*-aminobenzoico (PABA) e inhiben competitivamente a la enzima dihidropteroato sintetasa, que cataliza la formación del dihidropteroato a partir del 7,8-dihidropterin pirofosfato y el PABA; esto, finalmente, bloquea la síntesis del dihidrofolato. Dado que las células de mamífero carecen de esta vía biosintética (ellas necesitan incorporar el folato como nutriente), no se ven afectadas por esta inhibición. El trimetoprim actúa en una etapa posterior de la

vía metabólica, impidiendo el reciclaje que convierte dihidrofolato en tetrahidrofolato, el cual actúa como coenzima en la síntesis de timina. Esta etapa está presente en todas las células, pero trimetoprima tiene una gran afinidad por la enzima bacteriana, en lo que reside su toxicidad selectiva. Tanto trimetoprima como sulfametoxazol son activos frente a un amplio espectro de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y la combinación de ambos agentes es sinérgica; entre los patógenos que no son susceptibles destaca *P. aeruginosa* y bastantes cepas de *Streptococcus pneumoniae*.

Entre los efectos colaterales de estos agentes, cabe señalar náuseas, vómitos, cefaleas y fiebre, así como reacciones de hipersensibilidad. El uso prolongado de trimetoprima puede causar anemia, neutropenia y trombocitopenia.

1.2.14. Quinolonas.

La denominación “quinolonas” incluye una serie de compuestos antimicrobianos que comparten una estructura básica, la 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, con dos anillos condensados en los que se pueden introducir diversas sustituciones originando varias subfamilias de moléculas: derivados de la 4-quinolona, de la naftiridina, de la cinolina y de la piridopirimidina. Se trata de agentes que inhiben la replicación y reparación del DNA bacteriano, a través de su interferencia con el ciclo catalítico de las topoisomerasas. Estas enzimas controlan la topología del DNA, que, de acuerdo con la funciones requeridas en cada momento, pasan por los distintos estados de superenrollamiento negativo, relajación y superenrollamiento positivo. Este control lo ejercen mediante su capacidad para catalizar roturas en una o ambas cadenas de DNA. La topoisomerasa II, llamada girasa, introduce superenrollamiento positivo y relaja el negativo, mientras que la topoisomerasa IV elimina los superenrollamientos en ambos sentidos; ambas enzimas son dianas para las quinolonas, algunas de las cuales tienen mayor selectividad por una de ellas y otras por la otra. La interferencia de las quinolonas con el ciclo catalítico de las girasas determina la acumulación de dobles cortes en el DNA, lo que finalmente pone en marcha señales que conducen a la rápida muerte de las bacterias.

Los primeros miembros de esta familia, el ácido nalidíxico y algunos análogos, con un espectro de acción limitado (sin actividad sobre cocos Gram-positivos), se utilizaron

para tratar infecciones de vías urinarias. La segunda generación comprendió las primeras fluoroquinolonas, con amplio espectro de acción (la introducción de un átomo de flúor unido al carbono 6 del doble anillo quinolónico mejora las propiedades farmacológicas y amplía notablemente el espectro de acción); quizás el componente más característico de esta serie sea el ciprofloxacino, junto al que figuran otros antibióticos asimismo muy utilizados en clínica, como levofloxacino, norfloxacino (la primera en aparecer, en 1978) u ofloxacino. La tercera generación corresponde a moléculas con actividad incrementada frente a cocos Gram-positivos, como sparfloxacino, gatofloxacino y moxifloxacino (una molécula muy activa, denominada trovafloxacino, ha sido retirada por su hepatotoxicidad). Una última generación corresponde a las llamadas desfluoroquinolonas, como garefloxacino.

Entre los efectos colaterales de las quinolonas, se han descrito trastornos gastrointestinales y neurológicos. Las reacciones alérgicas son infrecuentes. Las afecciones a cartílagos y huesos, observadas en estudios toxicológicos en animales, no han sido documentadas en humanos.

1.3. RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIBACTERIANOS.

El concepto de resistencia se refiere a la capacidad de una bacteria patógena para crecer en presencia de concentraciones clínicamente útiles del antibiótico (es decir, concentraciones que se puedan alcanzar en el tejido infectado) [Rice *et al.*, 2003]. Hay varios tipos de resistencia. La resistencia intrínseca reside en la estructura o fisiología normal de un grupo bacteriano, y es la que define el espectro de acción de un antibiótico. Por ejemplo, *E. coli* tiene resistencia intrínseca a la vancomicina, porque este antibiótico no es capaz de atravesar la membrana externa de las bacterias Gram-negativas [Walsh, 2003]. La resistencia intrínseca es predecible, ya que depende de factores normales y, por tanto, esperables en una bacteria determinada; desde este punto de vista, no constituye un problema terapéutico. Por el contrario, la resistencia adquirida emerge como resultado de la alteración de un gen (mutación) o de la incorporación de nuevo material genético (transferido desde una bacteria resistente), cambios génicos todos ellos que se transmiten verticalmente a las bacterias hijas, constituyendo así un linaje resistente. La resistencia adquirida aparece a nivel de cepa y, como no depende de las características propias del taxón al que pertenece, su emergencia es impredecible; adicionalmente, en muchos casos en los que aparece como resultado de la transferencia de genes, se puede diseminar horizontalmente a otras cepas antes susceptibles al antibiótico [Jiménez-Valera *et al.*, 2003]. La capacidad de las bacterias para generar

resistencia adquirida a los antibióticos constituye, sin duda, uno de los mayores retos para la medicina del s. XXI.

1.3.1. Mecanismos de resistencia adquirida.

Los principales mecanismos responsables de la resistencia adquirida son la inactivación enzimática del antibiótico, la disminución de la permeabilidad para el mismo, su expulsión del citoplasma bacteriano por eflujo activo, la modificación o protección de su diana de acción y la adquisición de estructuras o vías alternativas que cumplan la función de la diana sin ser susceptibles al antibiótico [Figura 2].

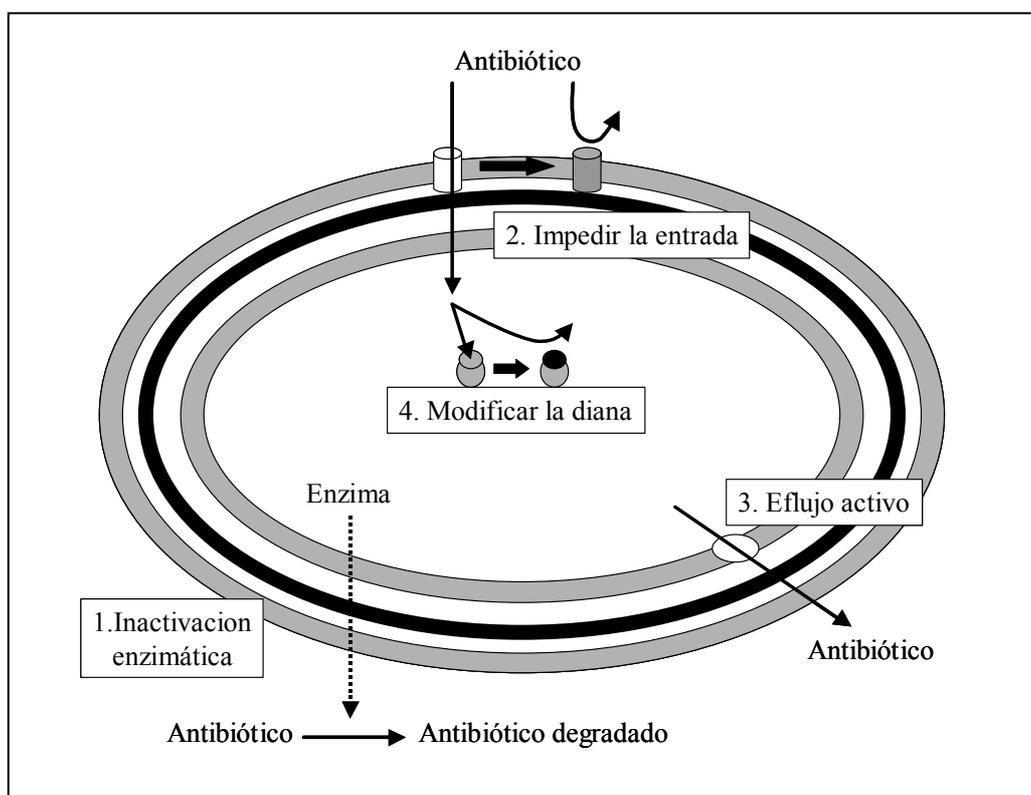


Figura 2. Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1, inactivación por enzimas, ya sean extracelulares o periplásmicas; 2, disminución de la permeabilidad (modificación de porinas); 3, eliminación por eflujo activo; 4, modificación de la diana o adquisición de alternativas resistentes al antibiótico.

Muchas resistencias con relevancia clínica se deben a la producción por la bacteria de enzimas que destruyen la actividad del antibiótico, de las que son ejemplo típico las β -lactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo β -lactámico.

Muchas β -lactamasas han debido evolucionar a partir de las PBPs; en efecto, las PBPs también abren el anillo β -lactámico, para establecer con él un enlace estable, que inhibe la función transpeptidasa de la PBP; en el caso de las β -lactamasas, esta unión es lábil, y el enzima, una vez que ha promovido la hidrólisis del anillo, se libera para atacar a otra molécula de antibiótico [Walsh, 2003]. Las β -lactamasas están codificadas por genes que pueden residir en plásmidos o en el cromosoma bacteriano; si la bacteria productora es Gram-positiva, las excreta extracelularmente, mientras que si es Gram-negativa, permanecen en el espacio periplásmico, donde puede actuar sobre las moléculas de antibiótico que penetran a través de la membrana externa para unirse a las PBPs. Las penicilinasas son β -lactamasas que actúan preferentemente sobre penicilinas, mientras que las cefalosporinasas son las que prefieren cefalosporinas como sustratos. La expresión “ β -lactamasas de espectro extendido” se refiere a enzimas que, como resultado de algunas mutaciones, son capaces de hidrolizar un amplio espectro de β -lactámicos, entre ellos oximino-cefalosporinas y monobactamas [Bradford, 2001]. Estas β -lactamasas de alta eficacia se han encontrado, en los últimos 15 años, en bacterias Gram-negativas como *P. aeruginosa*, *H. Influenzae* y algunas especies de enterobacterias.

Las β -lactamasas se clasifican en esquemas que agrupan separadamente las penicilinasas susceptibles al ácido clavulánico (serina- β -lactamasas), lo que incluye algunas enzimas de espectro extendido (como TEM-3 o SHV-2) y algunas cefalosporinasas y carbapenemasas inhibidas por el clavulánico; las cefalosporinasas no inhibidas por el clavulánico, que pueden conferir resistencia frente a todos los antibióticos β -lactámicos, excepto las carbapenemas; las metalo- β -lactamasas, que requieren zinc u otro metal pesado para actuar y que no son inhibidas por el clavulánico, el sulbactam u otros inhibidores de β -lactamasas; y un cajón de sastre con enzimas no bien caracterizadas [Rice *et al.*, 2003].

Además de las β -lactamasas, otras enzimas inactivadoras de antibióticos tienen interés clínico. El principal mecanismo de resistencia frente a los aminoglicósidos se basa en la producción de enzimas inactivadoras, codificadas por plásmidos, y que se pueden agrupar en tres clases: *N*-acetil-transferasas, que acetilan grupos amino; *O*-adenil-transferasas, que unen adenilato a grupos hidroxilo; y *O*-fosfo-transferasas, que

fosforilan grupos hidroxilo [Jiménez-Valera *et al.*, 2003]. Y, aunque la introducción en clínica de las estreptograminas ha sido relativamente reciente, ya se han descrito algunas enzimas capaces de inactivarlas [Eliopoulos, 2002].

Las bacterias pueden adquirir resistencia dificultando la entrada de antibióticos. Este mecanismo es especialmente operativo en bacterias Gram-negativas, en las que los antibióticos deben atravesar la membrana externa a través de porinas. Una mutación que afecte a una única porina puede determinar resistencia a varias familias de antibióticos. Este es el caso de una mutación cromosómica que altera la porina OmpF en *E. coli*, confiriendo resistencia simultáneamente a β -lactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol y quinolonas [Jiménez-Valera *et al.*, 2003]. La combinación de una entrada restringida de β -lactámicos y de una moderada producción de β -lactamasas periplásmicas puede conferir una eficaz resistencia frente a estos antibióticos [Rice *et al.*, 2003].

Las bacterias pueden ser capaces de expulsar moléculas tóxicas para ellas mediante un mecanismo que consume energía y que se asocia a la fuerza protón-motriz de la membrana citoplásmica. El eflujo activo puede constituir un mecanismo de resistencia frente antibióticos, cuya presencia se reconoce porque la bacteria acumula el antibiótico cuando está en presencia de inhibidores del metabolismo energético [Levy, 1992]. Las resistencias debidas a eflujo activo suelen incluir a varios antibióticos, aunque también hay casos de resistencia individual a determinados antibióticos [Lewis y Lomovskaya, 2002]. Se han descrito bombas de eflujo específicas para tetraciclinas, tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas, y macrólidos; en cuanto a las bombas multi-antibiótico, MdfA, en *E. coli*, promueve resistencia frente a antibióticos catiónicos y aminoglicósidos, mientras que AcrAB, en la misma especie bacteriana, lo hace para β -lactámicos, tetraciclinas, quinolonas, eritromicina y detergentes [Jiménez-Valera *et al.*, 2003].

Mutaciones puntuales en genes que codifican moléculas dianas pueden inducir cambios estructurales que afecten a la afinidad de la unión del antibiótico. Por ejemplo, muchas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas adquieren resistencia a quinolonas como consecuencia de mutaciones que cambian un aminoácido en las moléculas de la correspondiente topoisomerasa [Hooper, 2002]. También la recombinación entre genes

homólogos puede conducir a la resistencia: hay cepas de neumococo que han adquirido resistencia frente a penicilina como consecuencia de la recombinación con DNA transformante de estreptococos viridans, cuyas PBPs tienen baja afinidad para este antibiótico [Hooper, 2002]. En ocasiones, la modificación de la diana es resultado de la acción conjunta de varias enzimas: la resistencia de los enterococos a la vancomicina se debe a la adquisición de un transposón que codifica un enzima que hidroliza el dímero D-Ala-D-Ala, una deshidrogenasa que cataliza la producción de D-lactato a partir de piruvato y una ligasa que une el lactato a la D-Ala terminal; de esta forma, el pentapéptido termina en un residuo D-Ala-D-lactil que no tiene afinidad por la vancomicina [Jiménez-Valera *et al.*, 2003].

También hay casos en los que la diana con afinidad por el antibiótico se mantiene inalterada, pero la bacteria adquiere una nueva molécula, resistente, que cumple la misma función. Los estafilococos resistentes a meticilina contienen en el cromosoma el gen *mecA*, que codifica PBP 2a, similar a PBP 2 pero con escasa afinidad por los antibióticos β -lactámicos [Chambers, 1997].

Finalmente, una diana no modificada puede ser protegida de la acción de un antibiótico por proteínas de resistencia. La resistencia a tetraciclinas suele ser resultado de la presencia de genes que codifican proteínas capaces de proteger a los ribosomas de la acción inhibitoria del antibiótico [Jiménez-Valera *et al.*, 2003].

En la **Tabla 2** se indican los principales mecanismos de resistencia adquirida, de relevancia clínica, frente a algunas familias de antibióticos.

Tabla 2. Mecanismos de resistencia frente a algunos antibióticos.					
Antibióticos	Mecanismo de resistencia				
b-lactámicos	Producción de b-lactamasas				
	Restricción de entrada a través de la membrana externa				
	Eflujo activo				
	Modificación de PBPs				
	Adquisición de nuevas PBPs resistentes				
Aminoglicósidos	Enzimas modificadoras de aminoglicósidos				
	Modificación de la diana ribosomial				
Tetraciclinas	Restricción de entrada a través de la membrana externa				
	Eflujo activo				
	Proteínas protectoras de la diana ribosomial				
Macrólidos	Enzimas inactivadoras de tetraciclinas				
	Eflujo activo				
	Modificación de la diana ribosomial				
Quinolonas	Restricción de entrada a través de la membrana externa				
	Eflujo activo				
	Modificación de topoisomerasas				

1.3.2. Bases genéticas de la resistencia adquirida.

Como ya se ha indicado, una de las causas de la emergencia de resistencias es la mutación. En la naturaleza, las mutaciones ocurren de forma aleatoria, es decir, afectan a cualquier gen y no tienden a ningún fin beneficioso en relación con los factores ambientales. Sin embargo, estos factores pueden ejercer una presión selectiva, que favorezca el desarrollo de determinados mutantes. La presencia de un antibiótico debe seleccionar el crecimiento de mutantes espontáneos resistentes [Jiménez-Valera *et al.*, 2003].

Las bacterias pueden incrementar sus tasas de mutación como respuesta a una situación de estrés, en la que la replicación del DNA corre a cargo de las DNA-polimerasas IV y V, que cometen un número significativo de errores [Martínez y

Baquero, 2002]. Estos pueden ser corregidos por un sistema de reparación, pero, en algunas bacterias, los genes responsables de este sistema pueden estar también afectados por mutaciones; de hecho, las poblaciones bacterianas de cierto tamaño, pueden contener una subpoblación hipermutable [**Hooper, 2002**]. Si un antibiótico, operando a concentraciones inferiores a la CMI, induce un estado de estrés, pueden desarrollarse numerosos mutantes resistentes. Aunque estos mantengan su condición de hipermutabilidad, que puede añadir mutaciones adversas o hacer perder las ventajosas, tienen la posibilidad de transferir los genes mutados horizontalmente a otras bacterias (no hipermutables), lo que promoverá la emergencia de cepas con resistencia estable [**Kotewicz et al., 2003**].

La transferencia de genes es una causa eficiente de adquisición y diseminación de resistencias. Los tres mecanismos reconocidos de transferencia, transformación, transducción y conjugación, contribuyen de forma relevante a la emergencia de resistencias, pero el papel preponderante se atribuye a los elementos autotransmisibles por conjugación, que son plásmidos y transposones [**Jiménez-Valera et al., 2003**]. Hay que tener presente que los plásmidos conjugativos pueden albergar genes que medien resistencia a varios antibióticos, con lo que la bacteria receptora adquiere multiresistencias como consecuencia de un único evento [**Salyers y Whitt, 2002**]. Un elemento importante en la diseminación de multiresistencias es el integrón. Se define como tal un elemento genético que contiene un gen que codifica una integrasa y un sitio de unión (*att*), donde se pueden integrar “*cassettes*” génicas, esto es, elementos pequeños, móviles, que constan de un gen y un sitio de recombinación. Se conocen actualmente más de 70 *cassettes* portadores de un gen de resistencia a antibióticos [**Partridge et al., 2002**]. Un integrón puede capturar un número considerable de estas *cassettes*, bajo la influencia de un potente promotor de transcripción presente en el propio integrón. Los integrones se transfieren entre distintos replicones, pudiendo ubicarse en el cromosoma bacteriano, en plásmidos y en transposones [**Jiménez-Valera et al., 2003**].

Aunque los genes responsables de la resistencia a antibióticos pueden estar regulados, de forma que sólo se expresen en presencia del antibiótico, lo cierto es que generalmente su mantenimiento en la dotación génica de una bacteria conlleva un coste biológico, de modo que, si transcurre un tiempo suficiente si que actúe la presión

selectiva del antibiótico, las cepas resistentes deben resultar desfavorecidas en su competencia con las cepas susceptibles, mejor compensadas genéticamente (en el sentido del concepto anglosajón de “*fitness*”) [Martínez y Baquero, 2000]. Sin embargo, la reducción de *fitness* causada por la aparición o incorporación de genes de resistencia puede verse compensada por otras mutaciones, lo que hace que la cepa resistente sea igual o incluso más competitiva que la cepa original susceptible; esto explica que persistan las resistencias a algunos antibióticos mucho tiempo después de haber dejado de usarlos [Jiménez-Valera *et al.*, 2003].

1.4. METODOS DE LABORATORIO PARA DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.

1.4.1. Métodos clásicos.

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana es una de las funciones principales en laboratorios de microbiología clínica y se considera tan importante como la identificación del patógeno implicado. La prueba de la susceptibilidad constituye una guía para la selección de los agentes antimicrobianos más apropiados en aquellos casos en los que la resistencia a los antibióticos está aumentando y las opciones de tratamiento son limitadas.

El antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a ciertos microorganismos y refleja su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Las características farmacológicas del agente antimicrobiano, el lugar de infección, y los aspectos clínicos del paciente y de su infección, son los factores a tener en cuenta en la elección del quimioterápico .

Cada laboratorio de microbiología debe establecer un esquema sobre la organización y las técnicas de trabajo que aseguren la realización de pruebas de susceptibilidad. Las pruebas de sensibilidad tienen que estar estandarizadas correctamente y conforme a los procesos de control para asegurar su reproductibilidad.

Los siguientes procedimientos son métodos y criterios básicos utilizados y aceptados para el estudio de la sensibilidad.

1.4.1.1. Método de difusión en disco

Se basa en el trabajo de Bauer, Kirby y uno de los métodos que NCCLS recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana frente a los agentes antimicrobianos.

Cuando una célula microbiana es depositada sobre la superficie del agar, los nutrientes solubles en el medio pasan a su interior y se metabolizan. La bacteria comienza a multiplicarse y una vez que los nutrientes se agotan, cesa el crecimiento. Cuando los agentes antimicrobianos se colocan en el agar, son absorbidos por células microbianas o por el efecto de enzimas inactivantes del fármaco.

Los discos de antibióticos se fabrican transfiriendo un volumen determinado de los agentes antimicrobianos que se incluyen en un papel de filtro (6.5 mm). Los discos absorben 20 µg y se deben secar y refrigerar a -20° C.

1.4.1.1.1. Procedimientos

Se pican de 4 a 5 colonias (bien aisladas) de la misma morfología, de una placa de aislamiento y se transfieren a un tubo que contiene 4 a 5 ml de suero fisiológico.

Se ajusta la turbidez a 0.5 MacFarland en solución salina estéril. Utilizar una luz adecuada que sirva de ayuda en la comparación visual y leer el tubo a través de un fondo blanco.

Dentro de los 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, sumergir un escobillón estéril en dicha suspensión. Rotar el escobillón varias veces, presionando firmemente en la pared interior del tubo para quitar exceso de inóculo del escobillón.

Sembrar la superficie del Mueller-Hinton rayando con el escobillón. Repetir este procedimiento tres veces, y rotar la placa 60° cada vez para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Retirar la tapa de la placa unos 3-5 minutos, pero no más de 15 minutos para eliminar el exceso de humedad superficial antes de aplicar los discos antibióticos.

Colocar los discos apropiados, uniformemente en la superficie de la placa de agar utilizando una pinza estéril. El disco no debe ser movido una vez que haya tenido contacto con la superficie del agar ya que el antibiótico difunde rápidamente. Incubar unos 15 minutos a 35°C después de aplicar los discos. Las placas se deben incubar en aerobiosis (no CO₂) durante 16-18 horas (24 horas completas para estafilococos y enterococos para detectar la resistencia a oxacilina y vancomicina). Examinar cada placa y medir los diámetros de las zonas de inhibición completa, incluyendo el diámetro del disco.

1.4.1.1.2. Resultados e interpretación

Medir los tamaños de zonas de halo y consultar las tablas estándar e informar el organismo como susceptible, intermedio, o resistente. Las colonias grandes que crecen dentro de una zona clara de la inhibición deben ser identificadas y reexaminadas.

Vigilar los rangos de los halos y CMIs para las cepas patrones para supervisar el funcionamiento de la prueba de la difusión del disco.

Los microorganismos del control de calidad tales como *E. coli* ATCC 25922, y *S. aureus* ATCC 25923 se deben probar periódicamente para validar la exactitud de los procedimientos empleados.

1.4.1.1.3. Ventajas y desventajas

El método de la difusión en disco tiene varias ventajas.
Es una técnica sencilla de realizar y altamente reproducible.
Los reactivos son baratos.
No requiere de ningún equipo especial.
Los resultados son entendidos fácilmente por el personal clínico.
Es flexible con respecto a la selección de los agentes antimicrobianos.

La desventaja de la difusión del disco es que proporciona un resultado cualitativo.

Tabla 3. Ejemplos de antibióticos, los puntos de corte equivalente a la CMI para enterobacterias y diámetro del halo de inhibición para la cepa *E. coli* ATCC 25922 como control.

Antimicrobianos	Carga del disco (μg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI ($\mu\text{g/ml}$)		<i>E. coli</i> ATCC 25922
		Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
Ampicilina	10	≤ 13	14-16	> 17	≥ 32	< 8	16-22
Cefalotina	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8	15-21
Cefazolina	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8	23-29
Gentamicina	10	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4	19-26
Ticarcilina	75	≤ 14	15-19	≥ 20	≥ 128	≤ 16	24-30
Piperacilina	100	≤ 17	18-20	≥ 21	≥ 128	≤ 16	24-30
Cefuroxima	30	≤ 14	15-22	≥ 23	≥ 32	≤ 4	20-26
Cefpodoxima	10	≤ 17	18-20	≥ 21	≥ 8	≤ 2	23-28
Cefixima	5	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 4	≤ 1	23-27
Cefoxitina	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8	23-29
Cefotaxima	30	≤ 14	15-22	≥ 23	≥ 64	≤ 8	29-35
Ceftizoxima	30	≤ 14	15-19	≥ 20	≥ 32	≤ 8	30-36
Ceftriaxona	30	≤ 13	14-20	≥ 21	≥ 64	≤ 8	29-35
Cefepime	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8	29-35
Imipenem	10	≤ 13	14-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4	26-32
Meropenem	10	≤ 13	14-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4	28-34
Amikacina	30	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 32	≤ 16	19-26
Ciprofloxacino	5	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 4	≤ 1	30-40
Levofloxacino	5	≤ 13	14-16	≥ 17	≥ 8	≤ 2	29-37
Ceftazidima	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8	25-32
Kanamicina	30	≤ 13	14-17	≥ 18	≥ 25	≤ 6	17-25
Netilmicina	30	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 32	≤ 12	22-30
Tobramicina	10	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4	18-26
Tetraciclina	30	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 16	≤ 4	18-25
Cloranfenicol	30	≤ 12	13-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8	21-27
Lomefloxacino	10	≤ 18	19-21	≥ 22	≥ 8	≤ 2	--

Tabla 4. Patrones estándar del halo de inhibición para *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp.^a, puntos de corte equivalentes a la CMI y diámetro del halo de inhibición para la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como control.

Antimicrobianos	Carga del disco (µg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
		Resistente	Intermedia	Sensible	Resistente	Sensible	
Ceftazidima	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	22-29
Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	16-21
Cefepima	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	24-30
Cefoperazona	75	≤15	16-20	≥21	≥64	≤16	23-29
Imipenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	27-33
Meropenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	20-28
Amikacina	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤16	18-26
Tobramicina	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	19-25
Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1	25-33
Cefotaxima	30	≤14	15-22	≥23	≥64	≤8	18-22
Ceftriaxona	30	≤13	14-20	≥21	≥64	≤8	17-23
Cloranfenicol	30	≤12	13-17	≥18	≥32	≤8	--
Ceftizoxima	30	≤14	15-19	≥20	≥32	≤8	12-17
Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22	≥8	≤2	22-28

Tabla 5. Problemas que pueden surgir en la determinación de los halos de inhibición de las cepas utilizadas como control de calidad.

Observación	Diagnóstico	Solución
Halos de inhibición demasiado pequeños	1. Inóculo demasiado denso.	1. Comprobar y ajustar inóculo.
	2. Deterioro del antibiótico.	2. Comprobar potencia. Utilizar un disco nuevo.
	3. Cambio en la cepa control.	3. Utilizar una cepa nueva.
	4. Agar demasiado profundo.	4. Comprobar profundidad del agar.
	5. Lectura incorrecta de los resultados	5. Repetir con varios observadores.
Halos de inhibición demasiado grandes	1. Inóculo poco denso.	1. Comprobar y ajustar inóculo.
	2. Antibiótico demasiado potente.	2. Comprobar potencia. Utilizar un disco nuevo.
	3. Cambio en la cepa control.	3. Utilizar una cepa nueva.
	4. Agar demasiado delgado.	4. Comprobar la profundidad del agar.
	5. Lectura incorrecta de los resultados.	5. Repetir con varios observadores.

1.4.1.2. Método de EPSILON (E. test)

E. test (AB Biodisk, Suecia) es un método *in vitro* para pruebas cuantitativas de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias no-fastidiosas aerobias gram negativas (enterobacterias) y gram positivas y de bacterias fastidiosas (*N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* y *Haemophilus* spp.).

E. test abarca un gradiente de antibiótico predefinido para determinar la CMI en $\mu\text{g/ml}$ de diversos agentes antimicrobianos contra microorganismos en medios de agar.

E. test se basa en una combinación de conceptos de pruebas de dilución y de difusión y consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente de antimicrobiano predefinido equivalente a 15 diluciones. Un lado de la tira lleva la escala de lectura CMI en $\mu\text{g/ml}$ y el código de identidad del antibiótico. Las tiras de E. test deben almacenarse a -20°C y deben ser protegidas contra la humedad. Antes de ser utilizadas, deben atemperarse a temperatura ambiente durante, al menos, 30 minutos.

Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose, de este modo, a lo largo de la tira un gradiente exponencial de concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica y la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira.

Tabla 6. Requisitos del E. test se prueban con cada grupo de bacterias

Organismo	Medio	Suspensión	Turbidez McFarland	Temperatura	Atmósfera	Tiempo /hora
Aerobios	MHA	0.85 % NaCl	0.5	35°C	Ambiente	16 a 20
Anaerobios	Brucella sangre	Brucella caldo	1	35°C	80 a 85% N ₂ , 5 a 10% CO ₂ , 10% H ₂	24, 48 depende de especies
<i>Streptococcus Pneumoniae</i> y <i>Streptococcus spp.</i>	MHA+ 5% sangre de oveja	MH caldo	0.5 ó 1 si mucosa	35°C	5% CO ₂	20 a 24
<i>Haemophilus Influenza</i>	HTM	HTM caldo	0.5	35°C	5% CO ₂	20 a 24
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	GC agar base +suplementos definidos	MH caldo	0.5	35°C	5% CO ₂	20 a 24

1.4.1.2.1. La lectura de la CMI

Después del período de incubación, debe leerse la CMI en el punto de intersección entre el extremo de inhibición de la elipse y la tira de E-test. Cuando el crecimiento tiene lugar a lo largo de toda la tira y no se observa formación de la elipse de inhibición, la CMI se informará como mayor al valor máximo de la escala de lectura, y, por el contrario, cuando la elipse de inhibición se encuentre por debajo de la tira debe ser informado como menor al valor mínimo de la escala de lectura. Con ciertas combinaciones de bacterias-antibióticos, el extremo de la elipse de inhibición puede ser difuso.

Deben tenerse en cuenta una serie de consideraciones en la lectura de los resultados:

Cuando la CMI se observa entre dos marcas de la tira, el resultado se corresponde al valor superior.

Si se observan diversas intersecciones de crecimiento bacteriano en ambas partes de la tira, debemos informar la CMI como el valor superior pero la diferencia no debe ser superior de la mitad de una dilución doble. Por ejemplo, si la CMI en un lado de la tira es 8 y en el otro lado es 12, tendremos que informar la CMI como 12. Sin embargo, si en un lado es 8 y en la otra cara es 16 deberemos repetir la prueba.

Para *Enterococcus* spp, pueden aparecer colonias pequeñas en la zona de la inhibición, por lo que se debe considerar como resistente.

Cuando se lea la intersección de la elipse con las tiras de sulfamidas, trimetoprim o cotrimoxazol, deberemos leer la intersección en la zona de crecimiento denso y no considerar la existencia de crecimiento en la zona poco densa.

Si se observan colonias grandes en la zona de inhibición puede representar un cultivo mixto o variantes resistentes. Deberemos repetir el test a partir de colonias del cultivo primario. Si volvemos a observar el mismo patrón, se tienen que subcultivar las colonias que crecen en la zona de inhibición, identificarlas y volver a realizar el E-test. Si obtenemos el mismo resultado y el cultivo es puro, debemos informar como resistente.

1.4.1.3. Métodos de dilución

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa, habitualmente, mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluído en el medio de cultivo (caldo o agar).

Las primeras determinaciones fueron hechas utilizando una serie de tubos con caldo de cultivo y un rango determinado de antimicrobiano (macrodilución). Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de microdilución con caldo; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo,

fácilmente integrables en sistemas semiautomáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el grave inconveniente del incremento en el coste.

Los agentes antimicrobianos que se utilicen en métodos de dilución se pueden obtener de las compañías comerciales. Para los estudios *in vitro*, no se aconseja utilizar las preparaciones de uso clínico, sino que deben utilizarse sustancias valoradas de potencia conocidas (mg de la sustancia pura por cada mg de la sustancia valorada).

1.4.1.3.1. Método de dilución en agar

En este método se incorpora el antimicrobiano a evaluar a un medio (MHA). El antimicrobiano se añade cuando el medio aún está fundido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano y se inoculan con un replicador una vez que se haya solidificado el medio de cultivo. El número de placas de cada concentración a preparar vendrá dado por el número de microorganismos que se vaya a estudiar.

1.4.1.3.1.1. Preparación y almacenamiento de los medios

En la mayoría de los casos, el medio de cultivo a emplear es agar Mueller-Hinton, pero en función de los microorganismos y de sus necesidades nutritivas puede ser necesario añadir algún suplemento a este medio, o emplear un medio diferente.

Una vez esterilizado debe dejarse enfriar a unos 50°C antes de añadir suplementos (si es necesario) y las soluciones con antimicrobiano. El pH del medio oscila 7.2 y 7.4.

El medio con antimicrobiano se vierte cuanto antes (para evitar que el agar se solidifique) en placas de Petri estériles, evitando la formación de burbujas que dificultarían la posterior inoculación de las placas.

Posteriormente se dejan solidificar las placas, que se usarán inmediatamente o se almacenarán en frigorífico en bolsas de plástico. Para trabajos de referencia las placas no se deben almacenar más de cinco días, sin olvidar que algunos antimicrobianos (ampicilina, meticilina, imipenem, ácido clavulánico) son poco estables a 4-8°C y, por ello, las placas que los contienen deben usarse el mismo día de su preparación.

Tras sacar las placas del frigorífico, se deben dejar a temperatura ambiente unos 30 minutos antes de proceder a su inoculación, comprobando que no exista agua de condensación en la superficie de las mismas. Las placas húmedas se pueden secar en estufa dejando las tapas entreabiertas.

El inóculo final recomendado para la dilución en agar es 10^4 UFC/ml.

(Ver procedimientos en el capítulo métodos

1.4.3.1.2. Divulgación de resultados

Las cepas del control de calidad deben comprobarse, para que sus valores se encuentren dentro del rango aceptable. Asimismo, la placa libre de fármaco deberá examinarse para comprobar su pureza.

Los puntos finales para cada agente antimicrobiano se determinan lo mejor posible colocando las placas en un fondo oscuro y examinándolas a la concentración más baja que inhiben el crecimiento visible .

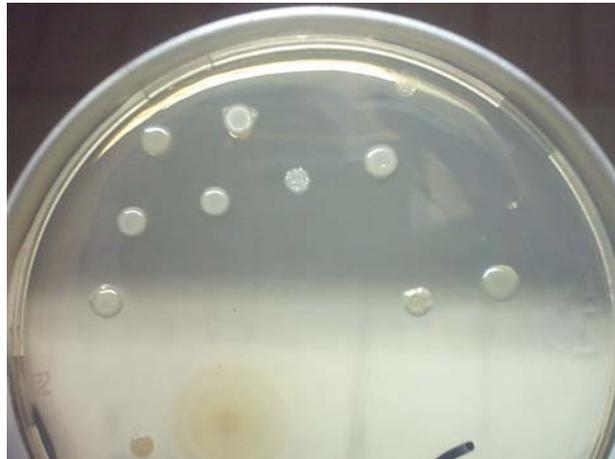


Figura 3. Placa de Muller-Hinton con muchas cepas de enterobacterias testadas por el método de dilución en agar.(dilucion de 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamicina).

1.4.1.3.1.3. Ventajas y desventajas

Ventajas:

Es una técnica bien estandarizada que se puede utilizar como referencia para evaluar la exactitud de otros sistemas.

Además, el método puede examinar un gran número de aislados y la contaminación microbiana se detecta más fácilmente.

Desventajas :

Las desventajas principales del método se asocian al tiempo y trabajo de preparar las placas.

1.4.1.3.2. Método de dilución en caldo

NCCLS recomienda para la mayoría de los microorganismos el uso del caldo de Mueller-Hinton, al cual serán agregados los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de organismos exigentes. Los medios deben tener un pH a partir de 7.2 a 7.4 y ajustar con Ca^{2+} (20-25 mg/l) y Mg^{2+} (10-12,5 mg/l). Esta cantidad de iones bivalentes asegura la reproducibilidad de la CMI de aminoglicósidos contra *P. aeruginosa* y las tetraciclinas contra la gran mayoría de microorganismos.

1.4.1.3.2.1. Las cepas de referencia

NCCLS recomiendan las siguientes cepas del control que se utilizarán con los métodos de dilución.

Staphylococcus aureus ATCC 29213: para antibióticos utilizados contra bacterias gram positivas.

Enterococcus faecalis ATCC 29212: para bacterias gram positivas.

Escherichia coli ATCC 25922: para las bacterias gram negativas.

1.4.3.2.2. Método de Macrodilución

Los agentes antimicrobianos están preparados siguiendo los protocolos de NCCLS y los tubos deben cerrarse y almacenarse a 8°C para evitar la evaporación y el deterioro de los agentes antimicrobianos.

1.4.1.3.2.2. Dilución de agentes antimicrobianos (NCCLS).

Tabla.7.

Paso	Concentración	Fuente	Volumen	CAMHB Volumen	Concentración Final
1	5120 µg/ml	Stock	1 ml	9 ml	512 µg/ml
2	512	Paso 1	1	1	256
3	512	Paso 1	1	3	128
4	512	Paso 1	1	7	64
5	64	Paso 4	1	1	32
6	64	Paso 4	1	3	16
7	64	Paso 4	1	7	8
8	8	Paso 7	1	1	4
9	8	Paso 7	1	3	2
10	8	Paso 7	1	7	1
11	1	Paso 10	1	1	0.5
12	1	Paso 10	1	3	0.25
13	1	Paso 10	1	7	0.125

1.4.1.3.2.3. Procedimientos

Un mililitro de cada concentración de los agentes antimicrobianos diluidos en caldo se transfieren a un grupo de tubos. Debe utilizarse un tubo sin antibiótico como control.

El inóculo final es 5×10^5 UFC /ml que es alcanzado por la inculcación de cuatro o cinco colonias del crecimiento bacteriano a CAMHB e incubado. Posteriormente turbidez debe ajustarse a la escala de 0,5 McFarland (10^8 UFC /ml). La suspensión se diluye 1:100 con caldo o salino (10^6 UFC /ml).

Cuando se agrega un mililitro de la suspensión bacteriana a cada tubo que contiene 1 ml de solución del fármaco diluido en CAMHB, el inóculo final será 5×10^5 UFC.

Los tubos se incuban a 35°C durante 16 a 20 horas antes de que se determine CMI.

Para la divulgación los resultados, los controles deben examinarse para la viabilidad y el inóculo se debe pasar a agar medio para saber si hay contaminación y comprobar su tamaño. El crecimiento en tubos está indicado por la turbidez.

La concentración más baja que inhibe totalmente el crecimiento del organismo se registra como CMI.

1.4.1.3.2.4. Ventajas y desventajas

Es un método de referencia estandarizado y fiable que es útil para los objetivos de la investigación pero por su naturaleza laboriosa y la disponibilidad de métodos más sencillos, este procedimiento no se utiliza en pruebas rutinarias de susceptibilidad en laboratorios de microbiología.

Tabla 7. Rangos aceptables de la CMI para cepas utilizadas como control en antibiogramas realizados mediante técnicas de dilución.

Antimicrobiano	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Acido nalidíxico			1-4	
Amikacina	1-4	64-256	0.5-4	1-4
Ampicilina	0.5-2	0.5-2	2-8	
Carbenicilina	2-8	16-64	4-16	16-64
Cefaclor	1-4		1-4	
Cefalotina	0.125-0.5		4-16	
Cefamandol	0.25-1		0.25-1	
Cefazolina	0.25-1		1-4	
Cefepima	1-4		0.016-0.12	1-8
Cefixima	8-32		0.25-1	
Cefotaxima	1-4		0.03-0.125	8-32
Cefoxitina	1-4		1-4	
Ceftazidima	4-16		0.06-0.5	1-4
Ceftriaxona	1-8		0.03-125	8-64
Cefuroxima	0.5-2		2-8	
Ciprofloxacino	0.125-0.5	0.25-2	0.004-0.016	0.25-1
Claritromicina	0.125-0.5			
Clinafloxacino	0.008-0.06	0.03-0.25	0.002-0.016	0.06-0.5
Clindamicina	0.06-0.25	4-16		
Cloranfenicol	2-8	4-16	2-8	
Eritromicina	0.25-1	1-4		
Fosfomicina	0.5-4	32-128	0.5-2	2-8
Gentamicina	0.125-1	4-16	0.25-1	0.5-2
Imipenem	0.015-0.06	0.5-2	0.06-0.25	1-4
Kanamicina	1-4	16-64	1-4	

Levofloxacino	0.06-0.5	0.25-2	0.008-0.06	0.5-4
Lomefloxacino	0.25-2	2-8	0.03-0.125	1-4
Meropenem	0.03-0.125	2-8	0.008-0.06	0.25-1
Moxifloxacino	0.016- 0.125	0.06-0.5	0.008-0.06	1-8
Nafcilina	0.125-0.5	2-8		
Nitrofurantoína	8-32	4-16	4-16	
Norfloxacino	0.5-2	2-8	0.03-0.125	1-4
Ofloxacino	0.125-1	1-4	0.015-0.125	1-8
Oxacilina	0.125-0.5	8-32		
Piperacilina	1-4	1-4	1-4	1-8
Rifampicina	0.004- 0.016	0,5-4	4-16	16-64
Tetraciclina	0.25-1	8-32	0,5-2	8-32
Ticarcilina	2-8	16-64	2-8	8-32
Tobramicina	0,125-1	8-32	0.25-1	0.25-1
Trimetoprim	1-4	<= 1	0.5-2	>64
Vancomicina	0.5-2	1-4		

1.4.1.4. Métodos aplicados a las Bacterias anaerobias

De los métodos de sensibilidad de bacterias anaerobias a agentes antimicrobianos, hay aprobadas recomendaciones del NCCLS, (M11- A4).

Dilución en agar, (método de referencia).

Microdilución en caldo: se recomienda para uso clínico diario.

En general, la difusión en agar no se recomienda porque no existe una buena correlación entre los diámetros de halos y CMI. Sin embargo, la técnica E. test presenta resultados concordantes con el método de referencia y podría ser útil en la práctica diaria.

1.4.1.4.1. Dilución en agar

Este método es el de referencia para determinar CMI de bacterias anaerobias y permite el estudio de la sensibilidad de muchos microorganismos simultáneamente.

Se puede utilizar en dos situaciones:

Para controlar periódicamente los patrones de sensibilidad de aislados anaerobios de un hospital de antibióticos en uso.

Para conocer los patrones de sensibilidad frente a los nuevos antimicrobianos.

1.4.1.4.1.1. Materiales

Medios de cultivo: Agar Wilkins-Chalgren

Para las bacterias que no crezcan en el medio anterior, se utiliza Agar Brucella suplementado con vitamina K1 y 5% de sangre de carnero lacada.

Medios de cultivo para preparar el inóculo: Caldo tioglicolato sin indicador enriquecido con hemina, Vitamina K1 y Na HCO₃.

Para ajustar la turbidez del inóculo: Caldo Brucella.

Control de calidad: Incluir, al menos, dos de las siguientes cepas control de ATCC :

Bacteroides fragilis ATCC 25285

En placa sin antibiótico: control positivo de crecimiento en anaerobiosis.

En placa sin antibiótico: control negativo de crecimiento en 5% de CO₂.

Indicador de anaerobiosis.

1.4.1.4.1.2. Procedimientos

1- Dilución de antibióticos: consiste en realizar varias concentraciones (generalmente al doble) de un antimicrobiano, cada una de ellas se mezcla con agar a 50° C y se vierte en una placa de Petri dejándose solidificar.

2- Preparación del inóculo: Se toma, con un asa de siembra, porciones de unas 5 colonias de un medio no selectivo (ej. agar sangre enriquecido) tras 24 h de incubación en anaerobiosis y se incuba de 6 a 24 h, hasta que se observa turbidez. La turbidez se ajusta con caldo Brucella a una densidad equivalente a la escala 0.5 de McFarland. La densidad final del inóculo, será de 1×10^5 en cada gota sobre la placa.

3- Inoculación: cada inóculo bacteriano se transfiere a un pocillo del replicador y las placas se inoculan con la gota recogida por un pincho de la parte que coge cada parte superior del replicador. Inocular 2 placas sin antibiótico al principio y final de cada

serie. Una se incuba en anaerobiosis como control positivo de crecimiento. La otra se incuba en atmósfera de CO₂ para detectar contaminación.

4- Incubación: una vez inoculadas las placas se pueden dejar 5-10 minutos en aerobiosis hasta que las gotas son absorbidas por el agar (no es necesaria la anaerobiosis durante la replicación). Tras esto se invierten las placas y se colocan en la jarra o en la cámara de anaerobiosis durante 48 h. a 35° C.

5- Resultados: después de la incubación anaerobia, la CMI es la concentración mínima del agente antimicrobiano que puede inhibir el crecimiento de aislado.

1.4.1.4.2. Microdilución en caldo

El aumento del número de antimicrobianos útiles en el tratamiento de las bacterias anaerobias, y el incremento de las resistencias a los mismos, da como resultado la necesidad de considerar un método que sea útil en los laboratorios clínicos para estudiar la sensibilidad de determinados anaerobios. El método de microdilución es el más práctico en estos momentos y da resultados comparables al método de dilución en agar que se considera el de referencia.

1.4.1.4.2.1. Materiales

Medio de cultivo para la microplaca: Caldo Wilkins-Chalgren suplementado con Vitamina K1 y hemina.

Medio de cultivo para preparar el inóculo: Caldo tioglicolato, igual al del método de dilución en agar.

1.4.1.4.2.2. Procedimiento

1- La preparación de las microplacas se realizará por el procedimiento estándar para la microdilución en caldo. El volumen final de caldo por pocillo será de 100 µl.

2- Preparación del inóculo: como el método anterior de dilución en agar.

3- Inoculación: varía de acuerdo al estado del antimicrobiano en las microplacas. Si se encuentra liofilizado, el inóculo va en el caldo utilizado para reconstituirlo a razón de 1×10^6 UFC/ml, echamos 100 µl por pocillo. Si el volumen de caldo en el pocillo es de 90 µl el volumen del inóculo es de 10 µl con una concentración de 10^7 UFC/ml. Siempre lo haremos para tener 10^5 UFC por pocillo.

4- Incubación: Las microplacas se incubarán a 35° C en la jarra o en la cámara de anaerobiosis durante 48 h.

5- La lectura se hará con luz indirecta o con un espejo. La CMI es la concentración a la que se observa un cambio marcado en la turbidez con respecto al control.

1.4.2. Métodos Especiales para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos

1.4.2.1. Capacidad bactericida

Para valorar la capacidad bactericida de los antimicrobianos se pueden emplear tres métodos: el cálculo de la concentración mínima bactericida (CMB), la curva de letalidad y la actividad bactericida del suero.

Se emplean más en investigación que en la práctica clínica de laboratorio, donde sólo se realizan en determinadas circunstancias.

En terapéutica: para el estudio de antibióticos considerados bactericidas en:

- 1- Infecciones graves como endocarditis estreptocócicas o por otras bacterias.
- 2- Infecciones en inmunocomprometidos.
- 3- Infecciones crónicas de prótesis y otras infecciones crónicas.
- 4- Exacerbaciones pulmonares agudas en fibrosis quística.

En investigación: para evaluar recientes antimicrobianos o los ya conocidos frente a nuevos patógenos y para determinar la capacidad y el poder bactericida.

Limitaciones: tiene baja reproducibilidad debido a razones técnicas. Influyen variables de los métodos de dilución: medios de cultivo, variaciones del medio elegido, iones, pH, inóculo, incubación. Se debe partir de un inóculo en fase logarítmica de crecimiento porque algunos antimicrobianos, como los β -lactámicos, sólo son bactericidas en este periodo. Asimismo, existen dificultades con los anaerobios de crecimiento lento y muy sensibles al oxígeno y con otros microorganismos exigentes.

1.4.2.2. Concentración mínima bactericida (CMB)

Su objetivo es determinar la menor concentración de antimicrobiano que es capaz de matar una cepa bacteriana, con el fin de compararla con la que alcanza en una determinada localización.

Para calcularla se emplean procedimientos en los que bacteria y antimicrobiano se enfrentan en un caldo de cultivo. Se parte de los mismos métodos utilizados para

obtener la CMI por dilución en caldo y sus modificaciones para bacterias exigentes. Se puede obtener empleando el procedimiento de macrodilución en tubo o microdilución en placa. Lo que se pretende es comprobar en los tubos o pocillos sin crecimiento qué concentración de antimicrobianos ha matado, no sólo inhibido, al aislado bacteriano estudiado.

1.4.2.3. Método de macrodilución en tubo

Aunque la NCCLS recomienda la microdilución en placa, se prefiere el método de macrodilución en tubo porque el inóculo es mayor y se controlan mejor las variables técnicas.

- 1- Determinar la CMI y tomar los tubos sembrados sin crecimiento, no el de control de esterilidad.
- 2- Agitar los tubos sin crecimiento y depositar 100 µl. de cada tubo sobre el medio de cultivo elegido y extender con un sembrador. De esta forma se diluye la concentración del antimicrobiano, se neutraliza su efecto y se favorece el recuento.
- 3- Incubar a 35°C y leer a las 24, 48 y 72 horas
- 4- Hay que recontar las colonias que han crecido tras 24-48 horas de incubación en las placas donde se sembró el inóculo original. Calcular el número de colonias que represente el 0,1%.
- 5- Recontar las colonias crecidas en los tubos sin crecimiento.

1.4.2.4. Curva de letalidad o de muerte

Se valora la capacidad de matar en relación con el tiempo y con distintas concentraciones fijas de antimicrobiano. En este sentido es complementario de la CMB.

Consiste en enfrentar un inóculo normalizado a concentraciones fijas de antimicrobiano en un caldo. Las concentraciones normalmente son la CMI, 2 y 4 veces la CMI y, a veces, las concentraciones que se alcanzan en suero, líquido o tejidos. Hay un control sin antibiótico. Se hace un recuento a las 0, 2, 4, 8, 24 y 48 horas. En antibióticos muy bactericidas, puede hacerse a las 1, 2, 4, 5, y 24 horas.

Los recuentos se expresan en escala semilogarítmica en el eje de las ordenadas y el tiempo en escala aritmética en el eje de las abscisas. El poder bactericida se determina en la caída de 3 logaritmos decimales en un tiempo determinado.

Es imprescindible el cálculo de la CMI preferentemente por el método de dilución en caldo.

Indicaciones y limitaciones: Se utiliza fundamentalmente en investigación de nuevos antimicrobianos o patógenos emergentes. En clínica puede emplearse sobre todo en las endocarditis.

Con esta técnica también se pueden valorar los fenómenos de persistencia, paradójico y de tolerancia.

Utilizando este método se ha comprobado que los aminoglicósidos y las quinolonas son rápidamente bactericidas y concentración dependiente.

Como limitaciones, es una técnica muy laboriosa y, en general poco reproducible ya que existen numerosos factores técnicos y metodológicos que pueden condicionar los resultados.

1.4.2.5. Actividad bactericida del suero

Es uno de los pocos métodos de sensibilidad que valora las interrelaciones existentes entre el antimicrobiano, el microorganismo y el paciente. Permite estudiar la actividad bactericida de un agente antimicrobiano en presencia de suero y frente al microorganismo responsable del proceso.

Indicaciones y limitaciones: Su utilidad más inmediata es la monitorización rápida de la terapia antimicrobiana en las indicaciones generales de las pruebas empleadas para determinar el poder bactericida.

Sus limitaciones derivan tanto de la falta de normalización como de diversos factores biológicos inherentes a la propia técnica, que pueden interferir con los resultados y con su interpretación.

1.4.2.6. β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas producidas por microorganismos capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico de las penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos β -lactámicos dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana.

En ocasiones, es necesario conocer, incluso antes del resultado de las pruebas de sensibilidad, si un aislamiento produce este tipo de enzimas. Para ello, se han desarrollado diferentes métodos rápidos de detección de β -lactamasas que, con una información preliminar, contribuyen a una correcta elección del antimicrobiano.

1.4.2.6.1. Métodos rápidos de detección de la producción de β -lactamasa

Este tipo de pruebas es útil en *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacteroides fragilis*, *Staphylococcus aureus*. En ellos es posible definir la resistencia a determinados β -lactámicos cuando el resultado es positivo. En otros microorganismos, *Enterobacteriaceae* o *Pseudomonas aeruginosa*, no deben emplearse, ya que la posible producción simultánea de diversas enzimas impide relacionar el resultado positivo con la resistencia a un determinado antibiótico o grupo de antibióticos

1.4.2.6.2. Metodo acidimétrico

Detecta ácido peniciloico después de la hidrólisis de la penicilina y su presencia se pone de manifiesto mediante un indicador de pH.

Puede realizarse en medio líquido o empleando discos o tiras de papel, generalmente comerciales. En el primer caso se emplean tubos estériles o placas de microtitulación con 0,1 ml de una solución de penicilina G pH 8,5 y rojo de fenol (0,5%). Los tubos una vez preparados pueden conservarse a -20°C durante 6 meses.

El cambio de esta solución de color violeta a amarillo antes de 15 minutos, después de hacer una suspensión con 4-5 colonias de un cultivo puro de una bacteria, indicará la producción de β -lactamasa. La ausencia de cambio de color durante estos 15 minutos se considerará como negativo para la producción de esta enzima. No obstante, algunas cepas de estafilococo, generalmente sin inducción previa, pueden requerir más de 15 minutos para demostrar su capacidad de producción de β -lactamasa. No deben añadirse cultivos líquidos sobre la solución de penicilina puesto que puede modificarse el pH y variar el resultado de la prueba.

Los sistemas acidométricos comerciales suelen utilizar discos o tiras de papel impregnados con una solución alcalina de penicilina G (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y 0,1% de azul de bromocresol. Una vez desecadas pueden conservarse a 4°C hasta 6 meses. Antes de utilizarse deben rehidratarse con 1-2 gotas de agua destilada, pudiendo, para ello, colocarse sobre un portaobjetos de vidrio o placa de petri.

La aparición de un color amarillo antes de 5 minutos después de colocar 2-3 colonias de un cultivo puro sobre la superficie de los discos o tiras rehidratados indicará la presencia de β -lactamasa.

1.4.2.5.6.2. Método yodométrico

El método yodométrico utiliza bencilpenicilina como sustrato, aunque también se ha descrito con alguna cefalosporina.

En presencia de β -lactamasa se produce ácido peniciloico o cefalosporánico. Disminuye el pH del medio y se reduce el yodo de la mezcla yodo-almidón desapareciendo el intenso color azulado de este complejo. En ausencia de β -lactamasa no se decolora la mezcla yodo-almidón.

Es menos sensible y específico que los otros dos métodos y, por ello, es menos empleado.

Puede realizarse en tubo o con tiras de papel. En tubo, se parte de alícuotas de 0,1 ml de una solución de penicilina G (6 mg/ml) disuelta en tampón fosfato 0.1 M pH 6.0. Los tubos se inoculan con las colonias del cultivo a estudiar hasta obtener una turbidez aproximada de 10^9 UFC/ml. Posteriormente, se añaden 20-25 μ l de una solución de almidón al 1%, se mantiene 30-60 minutos a temperatura ambiente y se añaden 20-25 μ l de una solución de yodo (2%)-yoduro potásico (53%). La mezcla se agita durante 1 minuto y debe decolorarse en menos de 10 minutos si el microorganismo produce β -lactamasa.

1.4.2.6.3. Método cromogénico

Detecta la presencia de β -lactamasa al hidrolizarse una cefalosporina cromogénica .

A diferencia del acidimétrico y yodométrico, el método cromogénico es altamente específico, aunque está limitado por la capacidad de hidrólisis que ejerza la β -lactamasa sobre la cefalosporina cromogénica que se emplee. La más utilizada es el nitrocefín ya que en pocos segundos puede obtenerse un resultado positivo. Habitualmente se comercializa en forma de discos. Éstos deben colocarse sobre un portaobjetos de vidrio o placa de petri y rehidratarse con 1-2 gotas de agua destilada. La aparición de un color rojo intenso en 1-2 minutos después de colocar 2-3 colonias de un cultivo puro sobre la superficie de los discos indicará la presencia de β -lactamasa.

1.4.2.6.4. Limitaciones de los métodos rápidos de detección de la producción de β -lactamasa.

Estas pruebas sólo indican la producción del enzima, no son cuantitativas y no sirven para saber el tipo de enzima que se produce. Para este último punto es más ilustrativa la información que se obtiene del propio antibiograma (fenotipo de sensibilidad).

Asimismo, la mayoría de los métodos emplean penicilina por lo que no es muy sensible cuando el microorganismo a estudiar produce una β -lactamasa con baja afinidad o tasa de hidrólisis con este sustrato .

Por otra parte, el resultado positivo indica que la cepa es resistente al antibiótico pero no excluye, en caso de ser negativo, que pueda existir otro mecanismo de resistencia y, por lo tanto, que pueda emplearse dicho antibiótico. Como ejemplo ilustrativo tendríamos los aislamientos de *H. influenzae* resistentes a ampicilina no productores de β -lactamasa y que deben su resistencia a la presencia de PBPs modificadas.

1.4.2.6.2. β -lactamasas cromosómicas inducibles

(Prueba de aproximación de discos)

El carácter inducible de la expresión enzimática es característico de un gran número de β -lactamasas cromosómicas presentes en *Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp., *Morganella morganii*, y *Proteus vulgaris*. Estas enzimas tienen la particularidad de expresarse habitualmente a niveles bajos (estado inducible) e incrementar su síntesis en presencia de determinados antibióticos β -lactámicos. La expresión permanente de niveles elevados de enzima, que determina resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, se produce por mutaciones en los genes reguladores. Estas mutantes pueden seleccionarse durante el tratamiento con determinados antibióticos β -lactámicos.

La presencia de estas β -lactamasas, al menos en su estado inducible, puede detectarse con una prueba de aproximación con discos. Se realiza un antibiograma convencional y se coloca un disco de cefoxitina u otro antibiótico inductor en las proximidades de un disco de cefamandol, cefuroxima o cefotaxima (antibiótico testigo). El microorganismo producirá una β -lactamasa inducible si se observa un halo de inhibición truncado del antibiótico testigo en la zona adyacente del disco del antibiótico inductor .

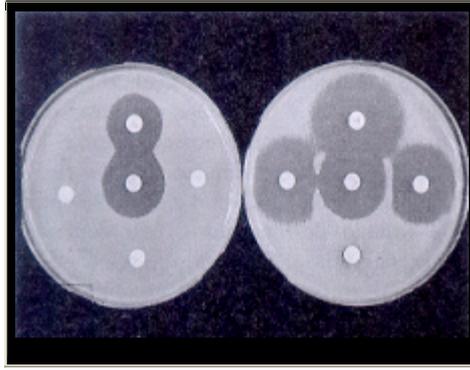


Figura 4. Prueba de aproximación de discos

No se recomienda aplicar esta prueba de rutina, ya que estas β -lactamasas inducibles se asocian con determinadas especies de microorganismos. En general, es suficiente con realizar una identificación correcta (género y especie) para predecir el posible desarrollo de resistencia durante el tratamiento.

1.4.2.6.3. Mecanismos de resistencia en *Staphylococcus aureus*

S. aureus ha sabido adaptarse con extraordinario éxito a las circunstancias adversas creadas por los antimicrobianos.

Los procesos de adaptación más espectaculares lo constituyen los mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, en particular el de resistencia a meticilina. Recientemente, se han descrito aislamientos con sensibilidad disminuida a los glicopéptidos, considerados como fármacos de elección en el tratamiento de las infecciones producidas por *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM).

La importante trascendencia clínica de este microorganismo y de sus mecanismos de resistencia hace imprescindible la puesta a punto de técnicas adecuadas de detección e identificación en el laboratorio que faciliten la implantación de medidas de control epidemiológico que impidan su diseminación.

1.4.2.6.3.1. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

La infección producida por SARM constituye un grave problema por la limitación de las opciones terapéuticas que conlleva. La naturaleza heterogénea de la expresión del gen *mecA*, determinante genético responsable de la producción de la PBP2a que condiciona la resistencia a la meticilina, implica que la mayoría de los métodos

descritos para su detección recurran a modificar las condiciones del cultivo para facilitar la expresión de este mecanismo de resistencia.

Casi todas las técnicas se aplican a colonias de *S. aureus* previamente aisladas de cultivos convencionales y sólo unos pocos plantean la detección e identificación directa a partir de las muestras obtenidas a los pacientes. En ambas situaciones se utiliza, por su mejor estabilidad, la oxacilina aunque algunos métodos emplean directamente la meticilina. No se recomienda utilizar otros β -lactámicos ya que en ocasiones pueden aparecer, a pesar de presentar el gen *mecA*, como falsamente sensibles a estos antibióticos.

1.4.2.6.3.2. Estudio de la sensibilidad a la oxacilina

Los discos de oxacilina son de 1 μ g y deben conservarse congelados hasta su utilización para evitar la inactivación del antibiótico.

Las técnicas de dilución en agar y microdilución tienen una sensibilidad superior al 95%. En ambos casos se recomienda añadir un 2% de NaCl al medio (Mueller-Hinton) y completar 24 h a 30-35°C el periodo de incubación. Además en la microdilución debe ajustarse la concentración de cationes del medio.

El inóculo se prepara a partir de una suspensión de colonias obtenidas de un cultivo en placa de 18 h y debe ser el habitual para cada una de estas técnicas (10^4 UFC/depósito y 5×10^5 UFC/ml, respectivamente).

La técnica de E-test tiene una buena reproducibilidad. Al igual que con la técnica de difusión se recomienda suplementar el medio de Mueller-Hinton con un 2% de NaCl y realizar la lectura del valor de la CMI a las 24h de incubación a 30-35°C.

Los criterios de sensibilidad y resistencia del NCCLS y del grupo español del antibiograma (MENSURA) son similares. En aquellos casos en los que existan dudas en la interpretación de los resultados, bien por el crecimiento de colonias en el interior de los halos de inhibición, por el crecimiento en velo en las técnicas de dilución o bien por la dificultad para establecer el valor de la CMI, debe recurrirse a la confirmación del resultado mediante la utilización de placas selectivas de oxacilina .

Los criterios de sensibilidad utilizados para los aislamientos de estafilococos coagulasa negativa son diferentes que los recomendados para *S. aureus*. Esto es debido a la demostración de la presencia del determinante *mecA* en la mayoría de los aislamientos que presentan valores de CMI de oxacilina entre 0,5 y 1 μ g/ml además de los que tienen valores iguales o superiores a 2 μ g/ml.

1.5. ANTIBIOGRAMA- SIGNIFICACIÓN Y INTERPRETACION

1.5.1. Introducción

La aparición cada vez más frecuente y diversa de los mecanismos de resistencia a nivel microbiano y sobre todo en aquellas bacterias patógenas facultativas e incluso oportunistas, ha traído consecuencias importantes en términos de morbilidad y mortalidad y millonarias pérdidas no sólo humanas sino económicas. Como es tal vez menos complicado evitar que tratar en este caso específico, es de suma importancia poder reconocer, descubrir, tratar eficazmente y prevenir las infecciones por microorganismos resistentes.

El antibiograma tiene como objetivo evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predicativo de la eficacia clínica.

El antibiograma debe mirarse como la unión de múltiples conceptos que se integran en una sugerencia acerca de la actividad de un antimicrobiano sobre un determinado patógeno, presente en un determinado sitio anatómico. La buena lectura del antibiograma cobra vital importancia, tanto por el interés del paciente como en una perspectiva de responsabilidad pública. Para una adecuada comprensión, se debe

dominar conocimientos, tanto sobre los mecanismos de resistencia bacteriana involucrados y del comportamiento biológico de algunos agentes antimicrobianos, como conocimientos de farmacocinética y farmacodinamia de los antibacterianos. No sólo se debe leer el antibiograma, sino que debemos analizarlo, con lo que podemos llamar una lectura interpretativa.

El proceso de antibiograma consiste en el reconocimiento de los fenotipos de resistencia y permite al microbiólogo:

- a) la detección de los mecanismos de resistencia, incluyendo los de bajo nivel de expresión.
- b) la modificación de la interpretación o categorización clínica que es incongruente con el mecanismo de resistencia deducido.
- c) la deducción de valores de sensibilidad de antimicrobianos no incluidos en el antibiograma.

Desde el punto de vista microbiológico esta actitud facilita el control de calidad y la validación de los resultados de sensibilidad y aumenta el valor de los resultados ya que facilita la caracterización de nuevos mecanismos y el establecimiento de la epidemiología de la resistencia. Asimismo, contribuye a la mejor adecuación de los tratamientos, ya que es útil para predecir el fracaso terapéutico derivado de la utilización de antimicrobianos en pacientes con infecciones producidas por microorganismos resistentes y también para la definición y el control de las políticas de antimicrobianos.

La lectura interpretada del antibiograma, realiza un análisis fenotípico de los resultados de las pruebas de sensibilidad fundamentada en el conocimiento de los mecanismos de resistencia y tiene como principal objetivo la detección de la resistencia y la predicción del fracaso terapéutico. La lectura interpretada no debe confundirse con el proceso de simple interpretación de los resultados de las pruebas de sensibilidad por medio de los puntos de corte y consiste en la traducción de los halos de inhibición o valores de CMI en las categorías clínicas “sensible”, “intermedia” o “resistente” que aparece en los informes de sensibilidad.

1.5.2. Criterios de los organismos internacional en la definición de los puntos de corte para definir sensibilidad y resistencia a los antibióticos.

El antibiograma en los laboratorios de microbiología, tiene dos objetivos principales: aconsejar al clínico en la elección del antimicrobiano adecuado para el tratamiento y ayudarle a ajustar el tratamiento iniciado de forma empírica que ha fallado.

Las consideraciones principales a tener en cuenta para la determinación de puntos de corte son las siguientes :

- 1- Clínicas: relacionadas con el lugar de infección y su accesibilidad.
- 2- Farmacológicas: relacionadas con los parámetros clásicos de los antimicrobianos como difusión tisular, ligazón proteica, metabolitos resultantes y su actividad antimicrobiana, dosis, vía de administración, etc.
- 3- Microbiológicas: basadas en el cálculo de la CMI que se toma como referencia es un guarismo estático que responde a la discreta concentración inicial del antibiótico, que no se corresponde con lo que sucede *in vivo*. Hay que analizar el inóculo, el medio, la especie bacteriana, etc.

Todos los métodos usados por comités internacionales intentan integrar el patrón de la susceptibilidad de una población de bacterias con los farmacocinéticos del antimicrobiano. Todos tienen muchos problemas en común que incluyen los siguientes:

- 1- La necesidad de una prueba de grupo antimicrobiano; ¿se puede tomar un agente como representante de otros?.
- 2- ¿Cómo considerar el cambio en los regímenes de la dosificación? (por ejemplo, penicilina y ampicilina que dosifican para *pneumococci* con susceptibilidad intermedia).
- 3- Infecciones en los sitios específicos, incluyendo zona urinaria, y la necesidad posible de puntos de corte de sitio específico.
- 4- El papel de la categoría intermedia entre la población susceptible y resistente.

1.5.3. Criterios de NCCLS

NCCLS es una organización global que su misión es realizar el valor de las pruebas médicas y los servicios médicos a través del desarrollo de estándares consensuados,

de las pautas, y de las mejores prácticas. Antibiograma está entre muchos servicios clínicos dentro del articulado de NCCLS.

El subcomité de NCCLS en antibiograma incluye a profesionales del laboratorio de microbiología, abastecedores del cuidado médico y educadores, y representante de FDA (Food and Drug Administration), de industria farmacéutica, y de industria de diagnóstico de microbiología.

1.5.3.1. Metas del subcomité de NCCLS

- Desarrollan métodos de referencia estandarizados para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.
- Proporcionan parámetros de control de calidad para los métodos estandarizados.
- Establecer criterios interpretativos para los resultados de las pruebas estandarizadas.
- Proporcionar sugerencias para probar y estrategias de divulgación que son clínicamente pertinentes.
- Refinan estándares y optimizan la detección de mecanismos de resistencia que emergen con el desarrollo de nuevos métodos revisados, criterios interpretativos, y parámetros del control de calidad.
- Informar usuarios sobre estándares y pautas a través de la comunicación multimedia.
- Fomentan un diálogo entre los usuarios de métodos (profesionales clínicos del laboratorio) y las personas que aplican los resultados (médicos y farmacéuticos).

1.5.3.2. Seleccionar los antimicrobianos

En las pautas de NCCLS, los agentes antimicrobianos son agrupados por pruebas de susceptibilidad y divulgación para evitar pruebas inadecuadas e innecesarias (la prueba de susceptibilidad de un microorganismo a cada antimicrobiano disponible es innecesariamente costosa y desperdiciadora de tiempo en que se saben los patrones clínicos totales de la eficacia y de la resistencia). Los agentes antimicrobianos son agrupados por la clase de los microorganismos contra los cuales son eficaces, patrones de la resistencia, y coste eficaces, clínicos (Tabla). Los grupos (también conocidos como racimos) incluyen agentes con espectros comparables de la actividad antimicrobiana; por lo tanto, la prueba de susceptibilidad de un microorganismo a un agente proporciona la información sobre la susceptibilidad del microorganismo a todos los agentes en el grupo sin probar cada uno.

1.5.3.3. Interpretación y criterios

Interpretación de los resultados de antibiograma establecidas por NCCLS, tomando en consideración los farmacocinéticos y los farmacodinámicos, la susceptibilidad *in vitro* (concentración inhibitoria mínima CMI), los datos clínicos del estudio, y los mecanismos de la resistencia. Las concentraciones de líquidos y tejidos son también importantes para analizar y deben ser considerados al tratar ciertos tipos de infecciones (sistema nervioso central). Los criterios interpretativos dependen del microorganismo específico y de los antimicrobianos y, en ciertos casos, la fuente del aislante (e.g., líquido cerebroespinal).

Un organismo se considera susceptible cuando las infecciones causadas por el organismo se pueden tratar con un antimicrobiano en la dosificación recomendada para ese tipo de infección y especie de la infección. Por el contrario, un organismo es señalado resistente si no es inhibido por la concentración sistémica generalmente realizable del agente con la dosificación normales, cuando hay mecanismos específicos de la resistencia (β -lactamasas), o cuando la eficacia clínica no se ha alcanzado confiablemente en estudios clínicos.

La susceptibilidad se considera intermedia cuando CMI acerca la concentración lograda generalmente en sangre y tejidos pero las tasas de respuesta son más bajas que éstos en especies susceptibles. La designación intermedia es aplicable a los antimicrobianos usados típicamente en dosis grandes o a las infecciones en sitios en los cuales la droga se concentra fisiológico (e.g., orina). **NCCLS; 2004, 2002**

Tabla 8. Grupos de los agentes antimicrobianos para la divulgación de la prueba de la susceptibilidad -NCCLS 2004

Group	Characteristic(s)
A	Rutina, panel de prueba primario para el microorganismo específico
B	<p>Importante para las infecciones nosocomiales</p> <p>Divulgó selectivamente para los organismos con resistencia al grupo A.</p> <p>Infecciones seleccionadas de la muestra. (3^o generación de cefalosporina para los bacilos entéricos del líquido cerebroespinal).</p> <p>Infecciones Polymicrobial .</p> <p>Alergia, intolerancia, falta de responder a los agentes del grupo A</p>
C	<p>Antimicrobianos alternativos o suplementales para las cepas endémicas o epidémicas resistentes a varios fármacos primarios.</p> <p>Tratamiento para los pacientes alérgicos a las antibioticos primarias.</p> <p>Tratamiento para las infecciones de microorganismos inusuales.</p> <p>Investigación epidemiológica</p>
U (Urine)	Solo para la zona urinaria (nitrofurantoina y ciertos quinoloneas). Estos agentes no se deben divulgar contra los patógeno recuperados de otros sitios de infección.
O (Other)	Indicación clínica para el grupo pero no candidatos a la prueba rutinaria en los Estados Unidos
Inv (Investigational)	Incluye los agentes que son de investigación para el grupo del organismo y no han aprobado por FDA

1.5.3.4. Métodos de susceptibilidad

NCCLS supervisan métodos de susceptibilidad a antimicrobiano, incluyendo la difusión en disco de Kirby-Bauer (con los diámetros de la zona correspondiendo a las categorías susceptibles, intermedias, y resistentes) y la CMI por dilución en caldo. El proceso de difusión en disco no permite una lectura directa del valor de la CMI, permite la clasificación de los aislados bacterianos como susceptibles, intermedios, o resistentes a una variedad de agentes antimicrobianos.

La CMI puede deducirse aproximadamente por la zona de inhibición seleccionando los puntos de corte de la CMI que definen las categorías de susceptibilidad y de resistencia para cada agente antimicrobiano. Los diámetros de la zona de la inhibición que corresponden a estos puntos de corte se establece inicialmente probando 300 ó más aislados bacterianos por métodos como difusión en disco y dilución, y correlacionando el diámetro de la zona de inhibición y la CMI de cada fármaco probado. Los aislados probados deben incluir algunas bacterias con mecanismos de resistencia.

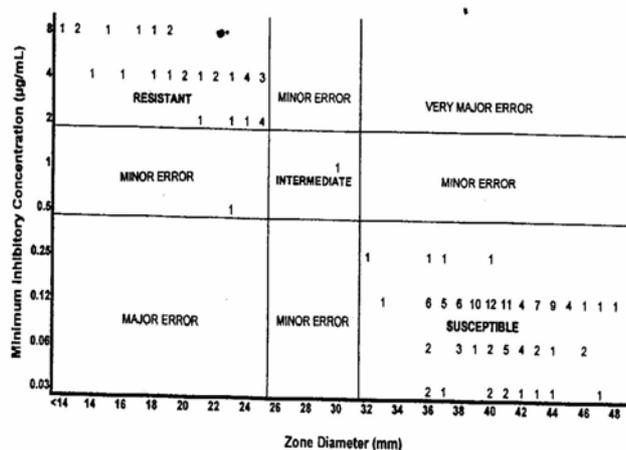


Figura 5. Comparación de los diámetros de zona con CMI del hipotético agente antimicrobiano.

1.5.4. Criterios de BSAC

La función primaria de la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* que prueba en laboratorios clínicos es proporcionar la información a los prescribidos en la quimioterapia apropiada, para si está será para la terapia o profilaxis en pacientes específicos, o a la ayuda en la formulación política antimicrobiana. Mientras que el clínico espera que el laboratorio proporcione la información que categoriza aislantes como susceptibles, intermedios o resistente, tales categorías no son óptimas para la epidemiología.

La definición de puntos de corte es una concentración discriminatoria usada en la interpretación de los resultados de la susceptibilidad que prueban para definir aislantes como susceptible, intermedia o resistente.

Tres características del antimicrobiano y el patógeno deben ser consideradas para decidir los puntos de corte:

1- La distribución de susceptibilidad.

2- Características farmacológicas del antimicrobiano.

3- Datos clínicos del resultado. Sin embargo, las dificultades pueden presentarse en la reconciliación de estos tres.

1.5.4.1. Proceso de fijar puntos de corte

Se obtiene información inicialmente sobre los farmacocinéticos de un antimicrobiano. Se determina CMIs para una gama de cepas relevantes patógenos (por lo menos 500 cepas). Los tamaños de la zona obtenidos a partir de los discos de 6 milímetros cargados con diversas cantidades de antibiótico, se obtienen para los mismos aislantes probados por método como difusión en disco estandarizado por BSAC. El análisis de Scattergram para estos diámetros de halo y CMIs se construyen según lo demostrado en la figura abajo.

El análisis de Metzler y DeHaan para determinar el rango de errores se aplica. Un rango de resistente falso y susceptible falso puede ser calculada y el punto de corte del diámetro del halo ser ajustada de modo que estos errores sean tan bajos como sea posible. El BSAC considera el rango de los errores aceptables como $< 5\%$ y $< 1\%$, respectivamente. Además, el tamaño de la zona de > 36 milímetros es indeseable pues causan dificultad en la lectura de las placas en un ajuste del laboratorio.

Finalmente, según lo demostrado en la figura, se obtienen rangos de divulgación falsas aceptables y por lo tanto, en una concentración tentativa del punto de corte de 1 mg/l, un

diámetro de halo de 20 milímetros se elige para distinguir lo más mejor posible entre los organismos susceptibles y resistentes.

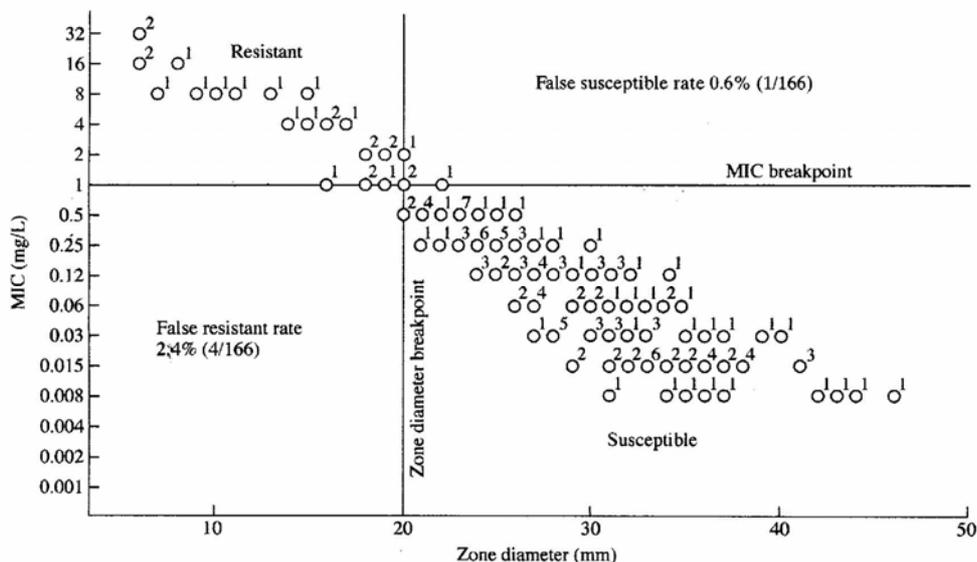


Figura 6. estándar método de disco. CMI frente diámetro del halo en milímetro.

1.5.5. Criterios de MENSURA

El grupo MENSURA (Mesa Española para la Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos, publicó un documento de consenso (1997-1998) que recogía los conceptos y criterios para la interpretación de los resultados del antibiograma y estableció los puntos críticos de sensibilidad y resistencia a los antimicrobianos. MENSURA estudia los puntos críticos de sensibilidad y resistencia a los nuevos antimicrobianos y revisa con periodicidad aquellos analizados inicialmente.

Selección de antimicrobianos en los estudios de sensibilidad

Cuando se procede a la realización de un antibiograma se seleccionan unos pocos antimicrobianos como representantes de las diferentes familias y clases. La información que se obtenga debe permitir:

- 1- Conocer y definir el perfil de sensibilidad de un microorganismo determinado.
- 2- Facilitar la caracterización de los mecanismos de resistencia.

3- Ofrecer opciones terapéuticas para la correcta selección del tratamiento antimicrobiano.

4- Evaluar los cambios en los comportamientos habituales de sensibilidad.

Los grupos establecidos para el estudio de los antimicrobianos son:

Grupo 1: antimicrobianos que deben estudiarse e informarse como norma.

Grupo 2: antimicrobianos que deben estudiarse de manera habitual pero que deben informarse selectivamente.

Grupo 3: antimicrobianos que deben estudiarse en un segundo nivel dependiendo del tipo de paciente, las características de la infección, el mecanismo de resistencia, etc., e informarse selectivamente.

Grupo 4: antibióticos que deben estudiarse siempre en los patógenos aislados en orina y muestras relacionadas.

La elección final de los antimicrobianos a estudiar es responsabilidad de cada laboratorio y fundamentalmente está condicionada por el tipo de microorganismo, los mecanismos de resistencia que les afectan, las características del paciente y de su infección y la política de antibióticos de cada área o institución.

La selección de los antibióticos para el antibiograma es independiente de la técnica empleada (difusión o dilución) y del empleo de métodos manuales o sistemas comerciales automáticos. La técnica de difusión con disco continúa utilizándose en la mayoría de los laboratorios de microbiología en España. Su vigencia está avalada por su sencillez, fácil estandarización y reproducibilidad, que hacen que incluso se utilice como técnica de referencia para comprobar resultados de sensibilidad obtenidos con otras técnicas. Además, su versatilidad ofrece la posibilidad de una selección individualizada y específica de los antibióticos a estudiar, pudiendo incluso modificarse ante cada microorganismo y situación.

El punto crítico de sensibilidad es la concentración crítica que tiende a identificar la población totalmente sensible, segregando de ella aquellas cepas bacterianas que presenten cualquier tipo de mecanismo de resistencia adquirido. La formulación del punto crítico de sensibilidad, que en la práctica representa la sensibilidad microbiológica, se sustenta en el análisis de la distribución de los valores de CMI para las distintas poblaciones (homogéneas en cuanto a especie). El punto crítico de resistencia se fundamenta en un criterio farmacológico-clínico y se considera como la concentración máxima de antibiótico que se obtiene con una dosificación convencional en el lugar de la infección o, en su defecto, en el compartimiento plasmático.

Tabla 9. Elección de antimicrobianos para la realización del antibiograma en microorganismos gramnegativos.

Antimicrobianos	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Vibrionaceae</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> y <i>otros BGNNF</i>	<i>Haemphilus</i> <i>spp</i>	<i>Maraxella</i> <i>catahhhalis</i>	<i>Neisseri</i> <i>aceae</i>
Penicilina					1
Amipicilina Amoxicilina	1		1 ^a	1 ^a	
Piperacilina Ticarcilina		2	1 ^b		
Amox.-ác. clavulánico Amp.-sulbactam	1	2 ^b	1	1	1
Pipe.-tazobactam	2	2			
Cefazolina	1				
Cefaclor			2	2	:
Cefuroxima	2		2	2	1
Cefoxitima	2				
Cefotaxima Ceftriaxona	1		2	2	1
Ceftazidima	2	1			
Cefepima	2	2			
Imipenem Meropenem	2 2	1 1	3 3		
Gentamicina	1				
Tobramicina	3	1			
Amikacina	2	1			
Claritromicina Azitromicina			2	2	
Norfloxacino	4				

Ciprofloxacino					
Ofloxacino	1	1	2	2	2
Levofloxacino					
Nitrofurantoína	4				
Tetraciclina	3	3	2	2	2
Doxiciclina					
Fosfomicina	2 , 4	2	2	2	
Rifampicina			3	3	2
Colistina	3	2			

*BNNF: bacilos gramnegativos no fermentados

1: estudiar e informar por norma.

2: estudiar por norma e informar selectivamente.

3: estudiar en un segundo nivel e informar selectivamente.

4: estudiar e informar en patógenos urinarios.

^aDeterminar la producción de betalactamasas.

^bExclusivamente ampicilina-sulbactam o sulbactam en *Acinetobacter* spp.

1.6. TEORÍA DE LA FORMACIÓN DE HALO Y CONCEPTO DE CONCENTRACIÓN CRÍTICA

1.6.1. Formación de halo

Cuando el disco impregnado con antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el disco absorbe agua y el antibiótico se extiende en el agar. La difusión de los agentes antimicrobianos a través del agar, depende, en gran parte, de la concentración del fármaco, del tamaño y forma de la molécula, del contenido de ion en el medio y de la temperatura. Al principio, la concentración de fármaco en el borde del disco es relativamente alta y disminuye progresivamente respecto a la distancia del depósito. A medida que el proceso de difusión sigue, las concentraciones del antibiótico en el disco y en el agar disminuyen. En la mayoría de los casos, la difusión del antibiótico se completa entre 6 - 8 horas. Después de 18-24 horas de incubación, los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición del crecimiento bacteriano (prácticamente, la mayoría de los agentes antimicrobianos producen una zona de inhibición parcial). Alrededor del disco de fármaco puede existir una zona de inhibición total seguida por otra de crecimiento parcial bacteriano y a continuación se ve una zona de crecimiento estimulado (Ver la figura debajo) .

La zona de crecimiento estimulado puede deberse a que en el margen de la zona de inhibición, existen más nutrientes, y, la masa total es mayor que en el fondo, donde los nutrientes desaparecen antes.

Ocasionalmente, puede existir otro anillo de crecimiento débil que representa células que inicialmente están inhibidas por la concentración de antibiótico en este punto. A medida que la continúa incubación, las células inhibidas crecerán cuando la concentración del fármaco sea reducida por la difusión continuada hacia fuera o el fármaco se deteriore a temperaturas de la incubadora.

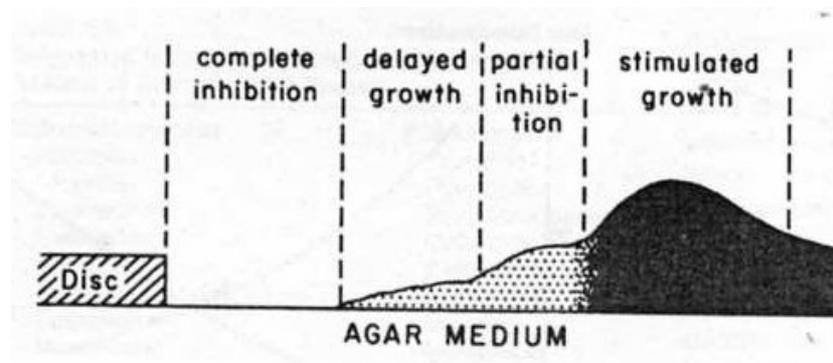


Figura 7. respuesta microbiana a concentración disminuida del agente antimicrobiano en el borde de una zona de la inhibición.

1. 6.2. Factores que influyen en los resultados finales

Hay muchos factores que pueden influir en los resultados finales de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana por difusión en agar.

Densidad del inóculo: 0,5 McFarland es estándar.

Profundidad del medio: la profundidad del agar debe ser 4mm.

Composición del medio: qué efecto tiene sobre la actividad de agentes antimicrobianos y el crecimiento del organismo. De los muchos medios disponibles, NCCLS recomienda el agar Mueller-Hinton porque da lugar a un crecimiento satisfactorio de la mayoría de los patógenos bacterianos; Mueller-Hinton no se emplea para especies fastidiosas que necesitan medios especiales, como *Haemophilus influenza* (HTM), *Neisseria gonorrhoeae* (GC).

Características del crecimiento del organismo.

Temperatura de incubación: normalmente a 35° C para un crecimiento óptimo de los patógenos humanos más comunes.

Tiempo de incubación: La incubación se realiza generalmente, entre 18 a 24 horas para las pruebas *in vitro*.

Presencia de proteínas del suero: muchos agentes antimicrobianos están limitados por la presencia de proteínas del suero que reducen el tamaño del halo; por ejemplo, la reducción de la zona inhibitoria de nafcilina de 4 a 5 milímetros en presencia de suero humano.

El proceso de difusión en disco no permite una lectura directa del valor de la CMI, permite la clasificación de los aislados bacterianos como susceptibles, intermedios, o resistentes a una variedad de agentes antimicrobianos.

La CMI puede deducirse aproximadamente por la zona de inhibición seleccionando los puntos de corte de la CMI que definen las categorías de susceptibilidad y de resistencia para cada agente antimicrobiano. Los diámetros de la zona de la inhibición que corresponden a estos puntos de corte se establece inicialmente probando 300 ó más aislados bacterianos por métodos como difusión en disco y dilución, y correlacionando el diámetro de la zona de inhibición y la CMI de cada fármaco probado. Los aislados probados deben incluir algunas bacterias con mecanismos de resistencia.

1. 6.3. Concentración crítica

Si se coloca un antibiótico con una concentración m_0 en la superficie de agar que inoculado con un inóculo estándar (0,5 MacFarland), entonces la incubación da lugar a una zona de inhibición que amplía una distancia x .

Si se asume que la zona que el borde de una zona fue determinado por la llegada a este punto de una concentración del antibiótico m' en un tiempo particular T_0 , entonces m' se puede calcular.

En $m' = \ln m_0 - x^2 / 4DT_0$ (las leyes de la difusión)

M_0 se puede elegir sobre una amplia gama de valores, y x medido. Con las condiciones constantes de inoculación, la temperatura, medios, y el tiempo del experimento, $4DT_0$ se pueden mantener constantes.

La concentración en la cual debajo de su valor, no produzca ninguna zona de inhibición por métodos de difusión, se llama carga crítica o concentración crítica.

La CMI puede ser calculado multiplicando la concentración crítica (CL) por un constante (k).

$$\mathbf{CMI = K \times CL}$$

2. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es proponer y evaluar una nueva técnica que permita definir a una cepa bacteriana como sensible, intermedia o resistente frente a un determinado agente antimicrobiano, mediante la observación de la existencia o no de un halo de inhibición del crecimiento en torno a dos discos con concentraciones distintas de dicho agente, previamente establecidas como puntos de corte en base al concepto de carga crítica. Las ventajas de una técnica semejante radican en la sencillez de ejecución, la lectura cualitativa sin necesidad de medir el diámetro de un halo y la ausencia de influencia de factores como la temperatura de crecimiento o la naturaleza del medio de cultivo.

Para desarrollar este objetivo se han elegido dos antibióticos de uso frecuente en clínica humana, el aminoglicósido gentamicina y la fluoroquinolona ciprofloxacino, que comparten la ventaja de su prolongada estabilidad en soluciones acuosas. El estudio se centró en bacterias patógenas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

Se diseñó un plan de trabajo que incluyó las siguientes fases:

1. Comparación de los valores de CMI para gentamicina y ciprofloxacino de un número suficiente de cepas de enterobacterias, obtenidos mediante el método de dilución en agar, el E-test y el sistema Wider.
2. Determinación de la carga crítica, es decir, la mayor concentración de antibiótico que no causa halo de inhibición en torno a un disco de tamaño estándar, para ambos antibióticos y cada una de las cepas incluidas en el punto anterior.
3. Análisis de la relación entre los valores de carga crítica y de CMI (eligiendo el obtenido por dilución en agar), para establecer los valores de corte, mayor y menor, que permitan predecir la sensibilidad o resistencia de una cepa mediante la observación de la ausencia o presencia de halos de inhibición.
4. Validación de la técnica propuesta, investigando su eficiencia para predecir el comportamiento de una cepa como sensible, intermedia o resistente, mediante la aplicación de los valores de corte obtenidos, al análisis de un conjunto de más de cien cepas distintas de las utilizadas en las fases anteriores del trabajo.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. BACTERIAS

3.1.1. Bacterias usadas en la determinación de CMI y carga crítica de gentamicina.

Se utilizaron 80 cepas de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, aisladas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, de Granada, a partir de diversas muestras patológicas como orina, exudados de herida, muestras respiratorias, sangre, etc. Para su identificación se utilizó el sistema automático WIDER (Francisco Soria Melguizo, S.A. Madrid), que simultáneamente suministró información sobre la sensibilidad a antibióticos.

La distribución de las cepas por especies se muestra en la **Tabla M1**.

Tabla M1. Bacterias utilizadas en ensayos de CMI y carga crítica con gentamicina

Especie	Número de cepas
<i>Escherichia coli</i>	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2
<i>Salmonella spp.</i>	3
<i>Proteus mirabilis</i>	4
<i>Proteus vulgaris</i>	1
<i>Serratia marcescens</i>	2
<i>Morganella morganii</i>	4
<i>Citrobacter freundii</i>	1

3.1.2. Bacterias usadas en la determinación de CMI y carga crítica de ciprofloxacino.

Estos ensayos con ciprofloxacino se realizaron con 91 cepas de enterobacterias, seleccionadas y clasificadas de la misma manera que en el caso anterior. Su distribución por especies se presenta en la **Tabla M2**.

Tabla M2. Bacterias utilizadas en ensayos de CMI y carga crítica con gentamicina

Especie	Número de cepas
<i>Escherichia coli</i>	67
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Salmonella</i> spp.	4
<i>Salmonella arizonae</i>	1
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Serratia plymuthica</i>	1
<i>Serratia marcescens</i>	2
<i>Morganella morganii</i>	1

3.1.3. Bacterias usadas en la evaluación de la técnica propuesta con gentamicina.

En las pruebas de evaluación con gentamicina se emplearon 102 aislados clínicos de bacterias Gram negativas, identificadas con los criterios ya expuestos. Es importante destacar que ninguna de estas cepas coincidió con las utilizadas en las determinaciones de CMI y carga crítica que llevaron al establecimiento de los puntos de corte. La distribución taxonómica se muestra en la **Tabla M3**.

Tabla M3. Bacterias utilizadas en ensayos de evaluación de la técnica propuesta con gentamicina

Especie	Número de cepas
<i>Escherichia coli</i>	57
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
<i>Salmonella</i> spp.	2
<i>Proteus mirabilis</i>	6
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6
<i>Serratia marcescens</i>	2
<i>Serratia plymuthica</i>	2
<i>Morganella morganii</i>	3
<i>Acinetobacter lowffi</i>	1

3.1.4. Bacterias usadas en la evaluación de la técnica propuesta con ciprofloxacino.

El mismo número de cepas de bacterias Gram-negativas (102) se empleó en la evaluación con ciprofloxacino; sin embargo, ambos conjuntos de cepas no coincidieron exactamente, como se observa en la Tabla M4, que presenta la correspondiente distribución taxonómica. Como en el caso anterior, ninguna de estas cepas coincidió con las utilizadas en las determinaciones de CMI y carga crítica para ciprofloxacino.

Tabla M4. Bacterias utilizadas en ensayos de evaluación de la técnica propuesta con ciprofloxacino

Especie	Número de cepas
<i>Escherichia coli</i>	53
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1
<i>Salmonella</i> spp.	1
<i>Proteus mirabilis</i>	6
<i>Acinetobacter</i> spp.	7
<i>Serratia marcescens</i>	2
<i>Serratia plymuthica</i>	1
<i>Morganella morganii</i>	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11

3.1.5. Cepas patrón.

Para contrastar la precisión de nuestras determinaciones de CMI, se utilizaron las siguientes cepas patrón, que fueron obtenidas de la NCCLS:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.
- *Escherichia coli* ATCC 25922.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO.

3.2.1. Agar MacConkey.

Este medio, selectivo para bacterias que crecen en presencia de sales biliares y diferencial para fermentadores de lactosa, se utilizó para el aislamiento y caracterización de las cepas de enterobacterias procedentes de muestras clínicas. Fue suministrado por Oxoid Limited (Basingstoke, England). Se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.2.2. Agar Muller-Hinton.

El Agar Mueller-Hinton se utilizó para las determinaciones de CMI por dilución en agar, E-test, pruebas de difusión de discos en agar y determinaciones de carga crítica. Este medio es el recomendado por la NCCLS para los ensayos de sensibilidad a antibióticos porque en él crecen bien la mayor parte de las bacterias patógenas, hay muy pocas diferencias entre los distintos lotes comercializados, lo que ayuda a una estandarización entre laboratorios, y además no contiene timina o timidina, que son inhibidores de sulfamidas y del trimetoprim. Se utilizó el suministrado por Biomedics (Madrid), que se adquirió ya preparado y distribuido en placas.

3.2.3. Agar-sangre.

Se trata de un medio enriquecido que permite el crecimiento de numerosas bacterias patógenas del ser humano. Fue utilizado para establecer la ausencia de influencia del medio de cultivo en los valores de carga crítica, por comparación a los obtenidos en Agar Mueller-Hinton. El Agar-sangre se prepara a partir de un medio base que contiene triptosa, extracto de carne, extracto de levadura, cloruro sódico y agar-agar, que se esteriliza a 121°C y se mantiene a sobrefusión, a 45°C, para añadir estérilmente 5% (v/v) de sangre desfibrinada. Las placas ya preparadas se adquirieron a Biomedics.

3.2.4. Medio de congelación.

Las cepas se conservaron en congelador a -80°C, en un medio de criopreservación preparado de la siguiente manera: para un volumen final de 180 ml, se mezclaron 15 ml de glicerina y 150 ml de Caldo de *Brucella* al 2.8 % (4.2 g de medio en 150 ml de agua); la mezcla se esterilizó en autoclave a 121° C durante de 15 minutos, antes de añadir 15 ml de suero de caballo estéril. El medio así preparado se distribuyó en criotubos de plástico (2 ml por tubo) y se guardó a 4 °C. Los reactivos mencionados se adquirieron a Oxoid.

3.2.5. Caldo de tripticasa-soja.

El medio TSB (“Trypticase soy broth”) se utilizó para la preparación y estandarización de inóculos. Este medio se obtuvo de Oxoid y se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.3. ANTIBIÓTICOS.

3.3.1. Gentamicina.

La gentamicina en polvo se obtuvo de los Laboratorios Normon, S.A. (Madrid), en forma de sulfato. Según certificado del departamento de Control de calidad de los

fabricantes, el producto consta de gentamicina C1 (29.11 %), gentamicina C1a (23.48 %) y gentamicina C2 y C2a (47.39 %), con una valoración final en agente antimicrobiano de 704 μg por mg, factor que se utilizó en los cálculos necesarios para la preparación de las concentraciones necesarias para las pruebas de dilución en agar y de determinación de carga crítica.

Para las pruebas de E-test, se utilizaron tiras de AB Biodisk, con un rango de concentraciones entre 0.016 y 265 μg por ml.

Finalmente, en las pruebas de difusión en agar, se emplearon discos de 10 μg adquiridos a Mast Diagnostics (Mast Group Ltd., UK.).

3.3.2. Ciprofloxacino.

El ciprofloxacino en polvo se obtuvo de Laboratorios Normon, S.A., con una riqueza de 100%.

Se utilizaron tiras de E-test, de AB Biodisk, con una rango entre 0.002 y 32 μg por ml.

Finalmente, se obtuvieron de Mast Diagnostics, discos conteniendo 5 μg de ciprofloxacino.

3.4. DETERMINACIÓN DE CMI POR DILUCIÓN EN AGAR.

3.4.1. Diluciones de los antibióticos.

Las determinaciones de CMI en agar se realizaron de acuerdo con el método aprobado por la NCCLS. Se partió de una disolución madre, en agua destilada, conteniendo 5,120 μg de antibiótico por ml. Para ello, en el caso de la gentamicina, y dado que la riqueza en agente activo era de 704 μg por mg, se pesaron 72.7 mg del producto, que se disolvieron en 10 ml de agua destilada. En el caso de ciprofloxacino, dada su riqueza del 100 %, se pesaron 51.2 mg que se disolvieron en 10 ml de agua

destilada. Las correspondientes diluciones seriadas se practicaron siguiendo el protocolo de la NCCLS [National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002], tal como se esquematiza en la **Tabla M5**:

Tabla M5. Protocolo de diluciones para CMI en agar (documento M7-A5 del NCCLS, 2002)

Paso	Concentración inicial (µg/ml)	Fuente	Volumen (fuente) (ml)	Agua destilada (ml)	Concentración intermedia (µg/ml)	Concentración final* (µg/ml)
1	5120	Sol. madre			5120	512
2	5120	Paso 1	1	1	2560	256
3	5120	Paso 1	1	3	1280	128
4	1280	Paso 3	1	1	640	64
5	1280	Paso 3	1	3	320	32
6	1280	Paso 3	1	7	160	16
7	160	Paso 6	1	1	80	8
8	160	Paso 6	1	3	40	4
9	160	Paso 6	1	7	20	2
10	20	Paso 9	1	1	10	1
11	20	Paso 9	1	3	5	0.5
12	20	Paso 9	1	7	2.5	0.25
13	2.5	Paso 12	1	1	1.25	0.125

*Resultante de añadir 1.5 ml de la dilución correspondiente a 13.5 ml de Agar Mueller-Hinton.

3.4.2. Preparación de las placas.

Se preparó un volumen apropiado de Agar Mueller-Hinton, que se fundió antes de su esterilización para distribuirlo en tubos de rosca, a razón de 13.5 ml de medio por tubo. Los tubos se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos, y se enfriaron en baño hasta 45°C. Al alcanzar esta temperatura, se añadió a cada tubo 1.5 ml de la correspondiente dilución de antibiótico, mezclando perfectamente el contenido, antes de verterlo en placas petri estériles, dispuestas en una superficie horizontal, donde se las dejó gelificar a temperatura ambiente. Algunas placas no recibieron antibiótico, para utilizarlas como control positivo de crecimiento. Una vez preparadas, las placas se guardaron en bolsas de plástico, en el frigorífico. Antes de su uso, las placas se aatemperaron a temperatura ambiente durante una hora.

3.4.3. Preparación de los inóculos, siembra, incubación y lectura.

De acuerdo con el protocolo de la NCCLS, los inóculos deben contener 10^4 bacterias viables, medidas como UFC (unidades formadoras de colonias). Para preparar los inóculos, se tomaron cuatro o cinco colonias del aislamiento de cada cepa y se disgregaron en 5 ml de TSB. Los tubos se incubaron a 35°C durante una noche. Una vez crecidos, los cultivos se diluyeron con solución salina estéril hasta alcanzar una turbidez similar a la del nº 0.5 de la escala de McFarland. Esta escala se preparó a partir de una disolución de ácido sulfúrico al 1% (1 ml de sulfúrico concentrado se disolvió en 90 ml de agua destilada, tras lo cual se completó el volumen con agua hasta 100 ml) y otra de cloruro de bario al 1.175 % (1,175 g de cloruro del bario se disolvió en 50 ml de agua destilada, para completar con agua hasta 100 ml) [Isenberg, 1992]. Para preparar el nº 5 de esta escala, se mezclaron perfectamente 0,5 ml de la solución cloruro de bario y 9,5 ml de la de ácido sulfúrico en tubo que se selló. La turbidez de esta suspensión equivale a la de una suspensión que contenga 1.5×10^8 bacterias por ml [Sydney *et al.*, 1978].

Una vez ajustada la turbidez del inóculo a la del nº 0.5 de la escala de McFarland, se diluyó 1:10 en solución salina estéril. Mediante el inoculador de Steer [Figura M1], se depositaron volúmenes de 1 μl en la superficie de las placas [Steer *et al.*, 1959], lo que equivale aproximadamente a 10^4 bacterias. Tras esperar unos minutos para que los inóculos se absorbiesen por el medio, las placas se llevaron a 35°C durante 24 h.

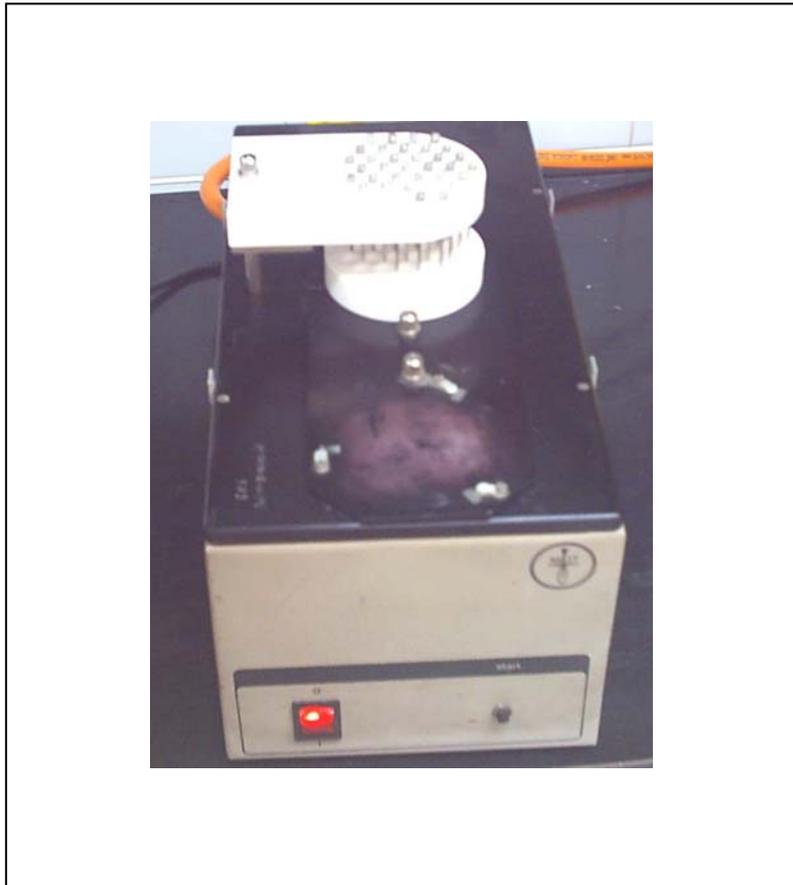


Figura M1. Inoculador de Steer.

Para realizar la lectura, cada placa conteniendo una concentración de antibiótico se superpuso a una placa sin antibiótico, tomada como control positivo de crecimiento, y se registró el crecimiento o ausencia del mismo de cada una de las cepas inoculadas. En la **Figura M2** se presenta un ejemplo de realización de esta técnica. La menor concentración que inhibió el crecimiento de cada cepa se tomó como valor de CMI.

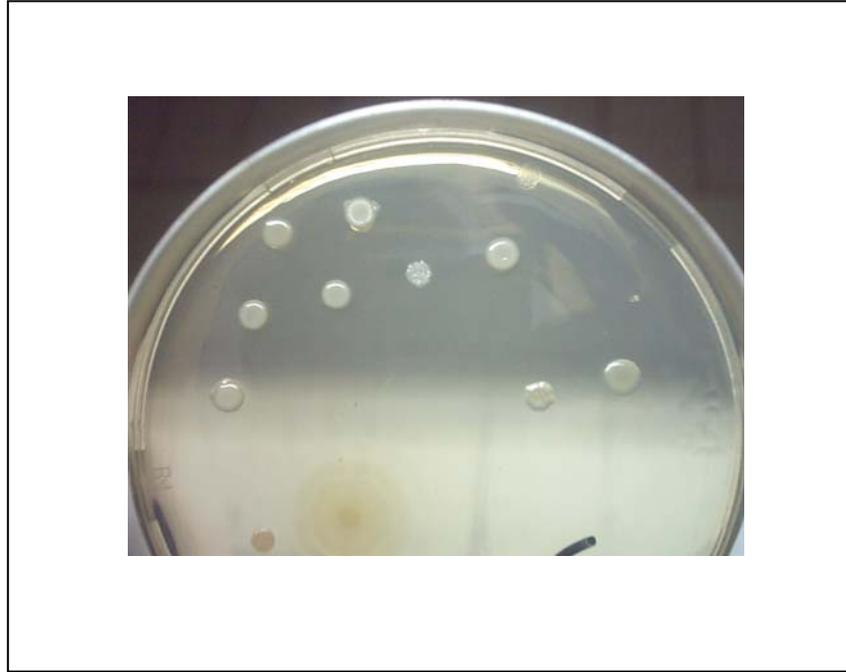


Figura M2. Determinación de CMI por dilución en agar. La placa de Agar Mueller-Hinton de la fotografía contenía 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, y en su superficie se inocularon 25 cepas de enterobacterias, algunas de las cuales no crecieron a esta concentración de antibiótico.

3.5. E-TEST.

3.5.1. Siembra de las placas.

Los inóculos se prepararon homogeneizando varias colonias de la placa de aislamiento en 5 ml solución salina estéril. La turbidez se ajustó al n° 0.5 de la escala de McFarland. La siembra de las placas de Agar Mueller-Hinton se realizó mediante un escobillón, que se sumergió en la suspensión bacteriana, se dejó escurrir para eliminar el exceso de líquido y se utilizó para diseminar el inóculo por la superficie de las placas. Una vez sembradas, se mantuvieron 15 min a temperatura ambiente para la absorción del líquido que impregnaba la superficie del medio.

3.5.2. Colocación de las tiras de E-test.

Las tiras se colocaron mediante unas pinzas estériles, depositándolas en la superficie del medio con la escala de CMI hacia arriba, ya que el antibiótico debe estar totalmente en contacto con la superficie del agar (si la tira se coloca del revés, no se formará ninguna elipse al no difundir el antibiótico). Las bolsas de aire se eliminaron presionando la tira, sin moverla, sobre la superficie de la placa, con ayuda de las pinzas.

3.5.3. Incubación y lectura.

Las placas se incubaron en posición invertida a 35°C durante 24 horas. La CMI se determinó como la concentración correspondiente a la intersección entre el extremo del halo de inhibición de crecimiento y la tira de E-test, con las precauciones descritas en el apartado correspondiente de la Introducción de esta Memoria. Un ejemplo de esta técnica se muestra en la **Figura M3**.



Figura M3. Lectura de una tira de E-test para ciprofloxacino en una placa de Agar Mueller-Hinton inoculada con *E. coli*

3.6. SISTEMA WIDER.

Los paneles para el sistema Wider (placas de 96 pocillos) se extrajeron de su envoltorio y se dejaron atemperar a temperatura ambiente. Mientras tanto, se procedió a preparar los inóculos, mediante el dispositivo suministrado por la propia casa comercial (Sistema de Inoculación Prompt™), con el que se tomaron una o dos colonias de la bacteria aislada, que se llevaron a la botella conteniendo 30 ml de solución acosa con surfactantes. El dispositivo inoculador distribuyó los inóculos en cada pocillo del panel, que se incubó a 35 °C durante 20 h, tras lo cual se procedió a la lectura, en el módulo lector, donde el análisis de la imagen de cada panel, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el resultado previo de la prueba de la oxidasa, suministró la información necesaria para la identificación de la cepa y la determinación de su sensibilidad a los antibióticos incluidos en el panel. La **Figura M4** representa el sistema Wider, uno de cuyos paneles se muestra en la **Figura M5**.

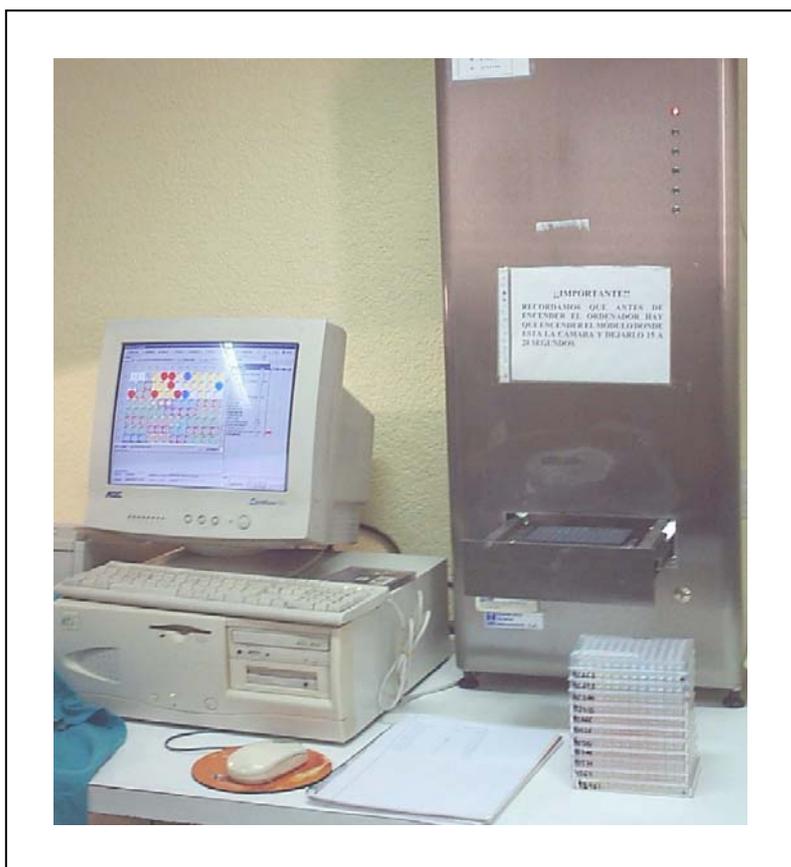


Figura M4. Cámara del sistema Wider conectada a un ordenador que posee la base de datos para interpretar la imagen de lectura del panel.

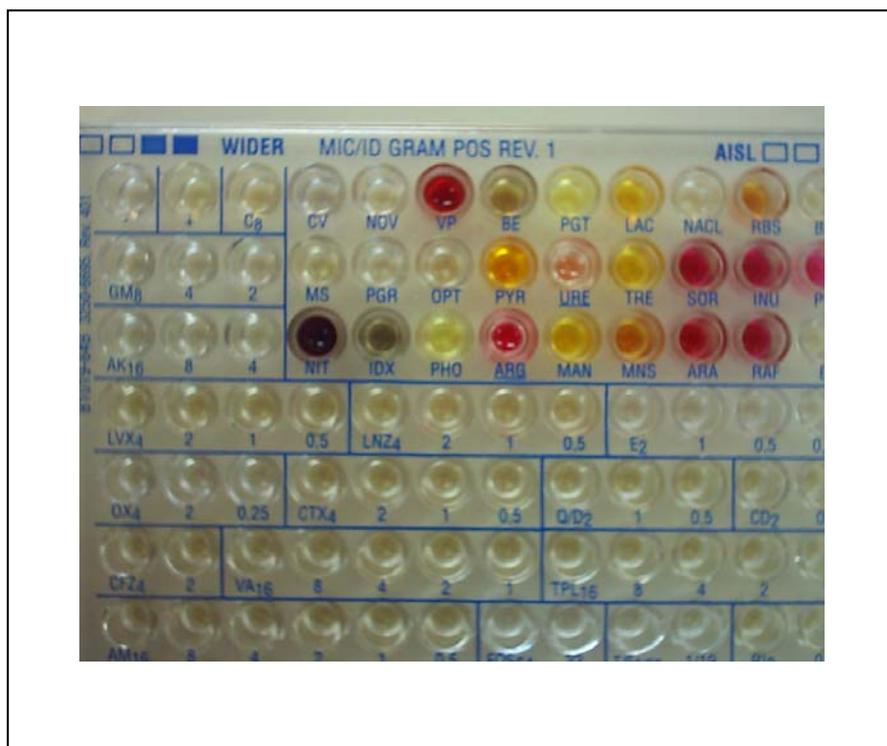


Figura M5. Imagen de un panel del sistema Wider, donde se aprecian algunas de las pruebas bioquímicas para identificación y diluciones de antibióticos para establecer la sensibilidad de la cepa examinada.

3.7. DETERMINACIÓN DE LA CARGA CRÍTICA (CM0).

3.7.1. Preparación de los discos.

Se utilizaron discos estériles para antibiograma (BD SensiDisc, Becton Dickinson, Heidelberg) de un diámetro de 6.5 mm. Tanto para gentamicina como para ciprofloxacino, se eligió trabajar con las siguientes cargas por disco (en μg): 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03 y 0.015. Dado que cada disco se cargó con 20 μl de líquido, se requirieron cantidades de 80 mg que, disueltas en 100 ml de agua destilada, proporcionaron la concentración requerida para el disco de mayor carga (16 μg en 20 μl). En el caso de la gentamicina, teniendo en cuenta la riqueza de 70.4%, se pesaron 113.6 mg; para el ciprofloxacino, se pesaron 80 mg. Las diluciones necesarias para la serie de cargas se realizaron de acuerdo con el esquema presentado en la **Tabla M6**.

Tabla M6. Protocolo de diluciones para los discos utilizados en la determinación de carga crítica.

Paso	Concentración inicial (µg/ml)	Fuente	Volumen fuente (ml)	Agua destilada (ml)	Concentración intermedia (µg/ml)	Concentración final* (µg/disco)
1	800	Sol. madre			800	16
2	800	Paso 1	1	1	400	8
3	400	Paso 2	1	1	200	4
4	800	Paso 1	1	7	100	2
5	100	Paso 4	1	1	50	1
6	50	Paso 5	1	1	25	0.5
7	100	Paso 4	1	7	12.5	0.25
8	12.5	Paso 7	1	1	6.25	0.125
9	6.25	Paso 8	1	1	3.125	0.06
10	12.5	Paso 7	1	7	1.56	0.03
11	1.56	Paso 10	1	1	0.78	0.015

*Concentración obtenida al impregnar cada disco con 20 µl de la dilución correspondiente de antibiótico.

Como se ha indicado, cada disco recibió 20 µl de la correspondiente dilución de antibióticos. Los discos se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron en frigorífico hasta su utilización.

3.7.2. Siembra de las placas y colocación de los discos.

Los inóculos se prepararon, igual que para el E-test, suspendiendo 4 o 5 colonias de la cepa aislada en 5 ml de solución salina estéril y ajustando a turbidez al nº 0.5 de la escala de McFarland. Para la inoculación, se sumergió un escobillón en la suspensión del inóculo, se eliminó el exceso de líquido y se diseminó por la superficie del medio tres veces, girando cada vez la placa para cubrir toda la superficie. En los diferentes ensayos realizados, se emplearon placas de Agar Muller-Hinton y de Agar-sangre, a efectos de establecer la influencia del medio de cultivo en los resultados. Las placas se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de aplicar los discos.

Los discos se tomaron con pinzas estériles y se depositaron en la superficie del medio, con las precauciones recomendadas para la técnica de antibiograma por difusión en agar. Simultáneamente a los discos con distintas concentraciones de antibiótico, se

dispusieron también, en las mismas placas, discos comerciales, conteniendo 10 μg de gentamicina y 5 μg de ciprofloxacino, como referencia.

3.7.3. Incubación y lectura.

Las placas se incubaron en posición invertida a 35°C y a 30°C (para examinar el efecto de la temperatura) durante 24 h, tras lo cual se procedió a la lectura. Para cada cepa, se buscó la máxima concentración de antibiótico que no desarrolló halo de inhibición del crecimiento. En el caso de los discos comerciales, se procedió a medir el diámetro del halo de inhibición. En la **Figura M6** se presenta una placa con discos de diferentes concentraciones, usada para la determinación de la carga crítica, que correspondería al disco marcado con una flecha.



Figura M6. Discos con concentraciones crecientes de antibiótico para establecer la carga crítica (disco marcado con una flecha).

3.8. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE CORTE PARA CARGA CRÍTICA.

Se realizó un análisis descriptivo de las variables, calculando medias y desviaciones para todas las medidas cuantitativas. Se representaron las gráficas resultantes de la regresión lineal, con inclusión de las bandas de aceptación. Se calcularon los valores de los coeficientes de correlación y de determinación de Pearson y se realizó el análisis de varianzas (ANOVA), considerando significativa la relación entre variables para valores de $P < 0.05$.

Dados los valores de CMI establecidos para definir una cepa como resistente, intermedia o susceptible a cada uno de los antibióticos estudiados, se procedió a calcular los valores de corte correspondientes a la carga crítica, esto es, dos concentraciones de antibiótico que permitan predecir el comportamiento de una cepa problema de acuerdo con los criterios de la **Tabla M7**. El cálculo se efectuó por interpolación, buscando las intersecciones de los mencionados valores preestablecidos de CMI con las bandas de aceptación.

Tabla M7. Criterios de interpretación de los discos con valores de corte para carga crítica.				
Presencia de halo de inhibición en torno al disco con la concentración que se indica			Interpretación	
Menor		Mayor		
Si		Si		Sensible
No		Si		Intermedia
No		No		Resistente

3.9. EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA PROPUESTA.

3.9.1. Preparación de los discos con valores críticos de corte.

Para la gentamicina, los resultados de las determinaciones de valores de corte para carga crítica fueron 0.46 μg y 7.24 μg . Para preparar los discos con el valor mayor, se requirió una disolución conteniendo 362 μg por ml, para lo cual se pesaron 51.42 mg de gentamicina (habida cuenta de la riqueza del producto) que se disolvieron en 100 ml de agua destilada, y se cargaron los discos con 20 μl de esta disolución. En cuanto al valor menor, la disolución preparada se diluyó 1:15.74, y los discos se cargaron con 20 μl de esta dilución.

Para el ciprofloxacino, los resultados fueron 0.08 μg y 1.45 μg . Se disolvieron 7.25 mg de ciprofloxacino en 100 ml de agua destilada y se cargaron con 20 μl los discos correspondientes al valor mayor. Para el menor, se preparó una dilución 1:18.13 de la anterior disolución, y de ella se cargaron los discos, siempre con 20 μl por disco.

3.9.2. Siembra e incubación de las placas.

La preparación de inóculos, siembra de las placas de Agar Mueller Hinton e incubación de las mismas se realizó como se ha descrito anteriormente (apartado 3.7.2). La lectura se limitó a establecer la presencia o ausencia de halo de inhibición de crecimiento en torno a los discos.

3.9.3. Análisis del valor predictivo en comparación con los métodos de difusión en agar y sistema Wider.

Inicialmente se llevó a cabo un estudio descriptivo para las variables cualitativas (Wider, difusión en agar y nueva técnica), a través del cálculo de frecuencias y porcentajes. Se aplicó además el test de Chi-cuadrado para comparar dichas mediciones, considerando resultados significativos para un valor de $P < 0.05$. Por último se calculó el coeficiente de concordancia de Kappa entre los resultados de las diferentes mediciones para la comprobación de la concordancia. El número de cepas usadas en

este análisis y su situación taxonómica se indicaron en los apartados 3.1.3 (gentamicina) y 3.1.4 (ciprofloxacino).

4. RESULTADOS

4.1. DETERMINACIONES DE CMI PARA GENTAMICINA

4.1.1. Determinaciones con cepas patrón.

Con el fin de evaluar la exactitud y fiabilidad de nuestra metodología de trabajo, se realizaron determinaciones de los valores de CMI de gentamicina para tres cepas patrón, cuyos rangos permisibles de valores de CMI han sido previamente establecidos por el NCCLS para el método de dilución en agar. Estas tres cepas se incluyeron, como controles, en cada conjunto de determinaciones con aislados clínicos de enterobacterias. Los resultados se presentan en la **Tabla R1**. Los valores obtenidos, tanto con el método de dilución en agar como con el E-test, estuvieron siempre dentro del rango aceptable según los estándares de la NCCLS.

Tabla R1. Valores de CMI de gentamicina para cepas patrón.

Cepa	Rango estándar (NCCLS) en µg/ml	Valores hallados (µg/ml)	
		Dilución en agar*	E-test
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.5 - 2	1, 2	2
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.25 - 1	0.5	0.25
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.12 - 1	0.25, 0.5	0.5

* Para cada cepa se realizó un mínimo de 4 determinaciones; se indican el o los valores obtenidos en todas ellas.

4.1.2. Determinaciones con aislados clínicos de enterobacterias.

La **Tabla R2** presenta los valores de CMI correspondientes a 80 aislados clínicos de enterobacterias, obtenidos por los métodos de dilución en agar y E-test, y la calificación de resistente, intermedia o sensible proporcionada por el sistema Wider. En 28 casos, se observaron discrepancias entre los valores obtenidos por dilución en agar y E-test; estas discrepancias fueron siempre iguales o inferiores a una dilución. Un análisis estadístico de los resultados comparados obtenidos por ambos métodos se presenta más adelante (apartado 4.3.1 y **Figura R1**).

De acuerdo con los criterios de la NCCLS, valores de CMI ≥ 16 μg de gentamicina por ml, corresponden a cepas resistentes; las cepas con CMI = 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se califican como intermedias; y valores de CMI ≤ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ corresponden a cepas sensibles. En el sistema Wider se usaron tres concentraciones del antibiótico: 8, 4 y 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; el criterio de interpretación dio como resistentes a las cepas con CMI > 8 , coincidiendo las especificaciones para intermedias y sensibles con el criterio de la NCCLS. De acuerdo con esto, de las 80 cepas estudiadas, 35 (43.75%) fueron calificadas como resistentes, 1 (1.25%) como intermedia y 44 (55%) como sensibles por el sistema Wider. Esto planteó cuatro casos de discrepancia con los dos métodos de determinación de CMI: la cepa 40 fue definida como resistente por Wider y E-test, pero la CMI por dilución en agar correspondió a la categoría intermedia. Las cepas 70 y 74 fueron resistentes por Wider pero intermedias por dilución en agar y por E-test. Finalmente, la cepa 73 fue sensible según Wider, pero intermedia de acuerdo con los métodos de dilución en agar y E-test.

Tabla R2. Valores de CMI de gentamicina para aislados clínicos de enterobacterias.

Cepa			Sistema Wider		CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
Número	Referencia	Identificación	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Categoría	Dilución en agar	E-test
1	25938	<i>Escherichia coli</i>	>8	R	64	48
2	25919	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	1	1
3	25921	<i>E. coli</i>	>8	R	64	64
4	25582	<i>Salmonella arizone</i>	≤ 2	S	1	0.75
5	25609	<i>Proteus mirabilis</i>	≤ 2	S	0.5	1
6	26079	<i>E. coli</i>	>8	R	16	12
7	26111	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	1	1
8	26224	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	1	0.75
9	26367	<i>Enterobacter cloacae</i>	≤ 2	S	1	0.75
10	26421	<i>E. coli</i>	>8	R	64	48
11	26354	<i>E. coli</i>	>8	R	32	64
12	26331	<i>E. coli</i>	>8	R	64	64
13	26832	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	0.25	0.25
14	26788	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	0.5	0.5
15	27241	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>8	R	32	24
16	27050	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	1	1
17	28036	<i>Serratia marcescens</i>	≤ 2	S	1	0.75
18	28341	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	1	1
19	28844	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	1	1
20	28759	<i>E. cloacae</i>	≤ 2	S	0.5	0.5
21	28937	<i>E. coli</i>	>8	R	64	48
22	29640	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	0.25	0.5
23	29836	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	0.5	0.5
24	30387	<i>Morganella morganii</i>	≤ 2	S	1	1
25	30534	<i>Klebsiella oxytoca</i>	≤ 2	S	0.25	0.38
26	30564	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	0.5	0.5
27	30887	<i>E. coli</i>	>8	R	64	64
28	30856	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	0.5	0.5
29	31118	<i>E. cloacae</i>	≤ 2	S	0.25	0.5
30	31532	<i>E. cloacae</i>	>8	R	32	32
31	31408	<i>E. coli</i>	>8	R	32	32
32	33336	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	0.25	0.38
33	33333	<i>Enterobacter aerogenes</i>	≤ 2	S	1	1
34	33211	<i>S. marcescens</i>	≤ 2	S	0.25	0.38
35	33834	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	1	0.75
36	36210	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	0.25	0.25
37	36279	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 2	S	0.5	0.5
38	36635	<i>P. vulgaris</i>	≤ 2	S	0.5	0.5
39	38699	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	1	0.75
40	38531	<i>Salmonella spp.</i>	>8	R	8	12

Tabla R2 (Continuación)

Cepa			Sistema Wider		CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
Número	Referencia	Identificación	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Categoría	Dilución en agar	E-test
41	38755	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	0.5	0.5
42	41994	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	1	1
43	42036	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	0.5	0.5
44	44496	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	2	1.5
45	45823	<i>Citrobacter freundii</i>	≤ 2	S	0.5	0.5
46	45976	<i>E. cloacae</i>	≤ 2	S	0.5	0.38
47	45995	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 2	S	0.5	0.5
48	46863	<i>E. coli</i>	> 8	R	64	64
49	46032	<i>K. oxytoca</i>	≤ 2	S	0.5	0.5
50	46136	<i>M. morgani</i>	> 8	R	64	64
51	46694	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	1	1
52	47544	<i>E. aerogenes</i>	≤ 2	S	0.5	0.5
53	50186	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 2	S	0.5	0.38
54	50303	<i>P. mirabilis</i>	≤ 2	S	0.5	0.5
55	50249	<i>E. coli</i>	> 8	R	64	64
56	50910	<i>Salmonella spp.</i>	> 8	R	64	64
57	50807	<i>E. coli</i>	> 8	R	32	32
58	50724	<i>E. coli</i>	> 8	R	64	64
59	51003	<i>E. coli</i>	> 8	R	16	16
60	51469	<i>E. coli</i>	> 8	R	64	48
61	51293	<i>M. morgani</i>	> 8	R	64	64
62	51627	<i>E. coli</i>	> 8	R	16	12
63	51651	<i>E. coli</i>	> 8	R	64	64
64	52159	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	1	1.5
65	52481	<i>K. pneumoniae</i>	> 8	R	16	16
66	52326	<i>P. mirabilis</i>	> 8	R	32	48
67	52646	<i>P. mirabilis</i>	> 8	R	32	64
68	52781	<i>E. coli</i>	> 8	R	64	64
69	53272	<i>E. coli</i>	> 8	R	64	64
70	53661	<i>E. coli</i>	> 8	R	8	8
71	60156	<i>E. coli</i>	> 8	R	64	64
72	64238	<i>M. morgani</i>	> 8	R	64	64
73	64473	<i>E. coli</i>	4	S	8	8
74	64736	<i>E. coli</i>	> 8	R	8	8
75	65964	<i>E. coli</i>	8	I	8	8
76	66285	<i>E. coli</i>	> 8	R	32	32
77	67145	<i>E. coli</i>	> 8	R	64	64
78	67231	<i>E. coli</i>	> 8	R	64	64
79	8049	<i>K. pneumoniae</i>	4	S	4	3
80	7098	<i>E. coli</i>	> 8	R	16	16

4.2. DETERMINACIONES DE CARGA CRITICA (CM0) PARA GENTAMICINA.

Con el objeto de estudiar la posible influencia del medio de cultivo y de la temperatura de crecimiento en las determinaciones de CM0, se realizaron ensayos en Agar Mueller-Hinton y Agar-sangre, incubando cada medio a 35°C y 30°C. Paralelamente, en las determinaciones realizadas en Agar Mueller-Hinton a 35°C, se incluyó siempre un disco comercial, conteniendo 10 µg de gentamicina, del cual se midió el diámetro del halo de inhibición.

Los resultados correspondientes a las 80 cepas de enterobacterias objeto de estudio se presentan en la **Tabla R3**. Teniendo en cuenta que, según el criterio de la NCCLS, un diámetro de halo ≤ 12 mm corresponde a cepas resistentes, de 13 a 14 mm a cepas intermedias, y ≥ 15 a cepas sensibles, los valores obtenidos con el disco comercial definieron 36 cepas resistentes (45%), 1 cepa intermedia (1.25%) y 43 cepas sensibles (53.75%). Sin embargo, las discrepancias con los resultados obtenidos por el sistema Wider, en la **Tabla R2**, son algo mayores, ya que la cepa 75, intermedia según Wider (y también según los valores de CMI obtenidos por dilución en agar y E-test), ofreció un diámetro de halo correspondiente a cepas resistentes. Por el contrario, la cepa 73 fue intermedia, según el diámetro de halo, pero sensible para el sistema Wider; recordemos que esta era una de las cepas discrepantes en la **Tabla R2**, ya que sus valores de CMI la calificaban también como intermedia. Otra cepa con discrepancias en los datos de la **Tabla R2**, la n° 40, resistente según Wider e intermedia por dilución en agar, fue sensible según su diámetro de halo. Finalmente, la cepa 79 fue calificada de sensible por los tres métodos representados en la **Tabla R2** pero resistente de acuerdo con el tamaño del halo.

La información suministrada por el tamaño del halo de inhibición, con un disco de 10 µg (dentro del rango probado para CM0, que incluye discos con 16 y con 8 µg), debe estar en relación con los resultados de la determinación de CM0 realizada en las mismas placas. Valores altos de CM0 deben corresponder a diámetros pequeños de halo, propios de cepas resistentes. Las cepas sensibles, por el contrario, tendrán valores bajos de CM0 y grandes diámetros de halo. En términos generales, los datos de la **Tabla**

R3 mantuvieron esta relación, con la única excepción de la conflictiva cepa 40, cuyo diámetro de halo fue excesivo teniendo en cuenta los valores de CM0.

Tabla R3. Valores de CM0 y halos de inhibición de gentamicina para aislados clínicos de enterobacterias.

Número	Cepa		CM0 (µg)*				Diámetro de halo (mm) para 10 µg
	Referencia	Identificación	AMH 35°C	AS 35°C	AMH 30°C	AS 30°C	
1	25938	<i>Escherichia coli</i>	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	0
2	25919	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.125	0.25	16
3	25921	<i>E. coli</i>	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	0
4	25582	<i>Salmonella arizone</i>	0.125	0.125	0.25	0.25	17
5	25609	<i>Proteus mirabilis</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	16
6	26079	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	7
7	26111	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.25	0.25	17
8	26224	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.25	0.25	16
9	26367	<i>Enterobacter cloacae</i>	0.125	0.125	0.25	0.25	17
10	26421	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	0
11	26354	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	0
12	26331	<i>E. coli</i>	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	0
13	26832	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.25	0.25	16
14	26788	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	17
15	27241	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	8	8	4	7
16	27050	<i>E. coli</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	17
17	28036	<i>Serratia marcescens</i>	0.25	0.25	0.25	0.5	17
18	28341	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.25	0.125	18
19	28844	<i>E. coli</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	18
20	28759	<i>E. cloacae</i>	0.125	0.25	0.25	0.25	18
21	28937	<i>E. coli</i>	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	0
22	29640	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	18
23	29836	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	20
24	30387	<i>Morganella morganii</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	16
25	30534	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	17
26	30564	<i>E. coli</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	16
27	30887	<i>E. coli</i>	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	0
28	30856	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.25	0.125	19
29	31118	<i>E. cloacae</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	18
30	31532	<i>E. cloacae</i>	8	4	8	4	0
31	31408	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	0
32	33336	<i>E. coli</i>	0.125	0.06	0.125	0.06	18
33	33333	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.125	0.125	0.25	0.25	18
34	33211	<i>S. marcescens</i>	0.125	0.125	0.25	0.125	20
35	33834	<i>E. coli</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	16
36	36210	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	17
37	36279	<i>K. pneumoniae</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	17
38	36635	<i>P. vulgaris</i>	0.125	0.25	0.125	0.125	18
39	38699	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.25	0.25	17
40	38531	<i>Salmonella spp.</i>	4	4	4	4	17

Tabla R3. (Continuación)

Número	Cepa		CM0 (μg)*				Diámetro de halo (mm) para 10 μg
	Referencia	Identificación	AMH 35°C	AS 35°C	AMH 30°C	AS 30°C	
41	38755	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	18
42	41994	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	18
43	42036	<i>E. coli</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	18
44	44496	<i>E. coli</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	18
45	45823	<i>Citrobacter freundii</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	17
46	45976	<i>E. cloacae</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	17
47	45995	<i>K. pneumoniae</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	17
48	46863	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	0
49	46032	<i>K. oxytoca</i>	0.125	0.25	0.125	0.25	18
50	46136	<i>M. morgani</i>	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	0
51	46694	<i>E. coli</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	17
52	47544	<i>E. aerogenes</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	17
53	50186	<i>K. pneumoniae</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	18
54	50303	<i>P. mirabilis</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	20
55	50249	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	0
56	50910	<i>Salmonella spp.</i>	8	8	4	4	7
57	50807	<i>E. coli</i>	8	8	4	4	7
58	50724	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	0
59	51003	<i>E. coli</i>	4	4	4	4	7
60	51469	<i>E. coli</i>	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	0
61	51293	<i>M. morgani</i>	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	0
62	51627	<i>E. coli</i>	4	4	2	2	9
63	51651	<i>E. coli</i>	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	0
64	52159	<i>E. coli</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	19
65	52481	<i>K. pneumoniae</i>	4	4	4	2	8
66	52326	<i>P. mirabilis</i>	8	8	8	8	7
67	52646	<i>P. mirabilis</i>	8	8	8	8	7
68	52781	<i>E. coli</i>	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	0
69	53272	<i>E. coli</i>	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	0
70	53661	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	10
71	60156	<i>E. coli</i>	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	0
72	64238	<i>M. morgani</i>	8	8	8	8	7
73	64473	<i>E. coli</i>	1	1	1	1	13
74	64736	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	8
75	65964	<i>E. coli</i>	1	1	1	1	11
76	66285	<i>E. coli</i>	8	8	8	4	7
77	67145	<i>E. coli</i>	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16	0
78	67231	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	7
79	8049	<i>K. pneumoniae</i>	2	2	2	1	11
80	7098	<i>E. coli</i>	4	4	4	4	7

* Valores de carga crítica obtenidos en Agar Mueller-Hinton (AMH) y Agar-sangre (AS) a 35 y 30°C.

En lo que se refiere a la influencia de factores como el medio de cultivo o la temperatura de incubación en los valores de CM0, se observó una notable homogeneidad de los resultados; las diferencias para una misma cepa nunca fueron mayores a una dilución, y no se registró ninguna asociación entre tendencia a valores mayores o menores de CM0 y un determinado medio o temperatura. El análisis estadístico de estas comparaciones se aborda en el apartado siguiente (4.3) y en las **Figuras R2, R3 y R4**.

4.3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE CORTE PARA CARGA CRÍTICA DE GENTAMICINA.

4.3.1. Comparación de los valores de CMI obtenidos por dilución en agar y por E-test.

La **Figura R1** representa la comparación de valores logarítmicos de CMI obtenidos por los métodos de dilución en agar y E-test. Se obtuvo una recta de regresión, que se presenta acompañada de las correspondientes bandas de aceptación, que definen el intervalo de aceptación. Los datos del análisis estadístico se presentan en la **Tabla R4**. El valor de R (coeficiente de correlación de Pearson) fue de 0.993, muy próximo a 1 (valor máximo posible), lo que indica una excelente proximidad de los distintos puntos a la recta de regresión. El coeficiente de determinación R^2 fue de 0.987 (corregido, 0.986), lo que se interpreta como que más del 98% de la variabilidad de Log_{10} de los valores de CMI por dilución en agar se puede predecir por los valores de Log_{10} de CMI por E-test. El pequeño valor de la desviación típica (0.10766) revela la homogeneidad de los datos. El ANOVA ofreció un valor de 5757.67 para la F de Snédecor, con $P < 0.001$, indicando que la regresión se acepta como significativa. Por tanto, el análisis de los resultados corroboró la excelente correlación entre ambos métodos, diluciones en agar y E-test, como ya se había puesto de manifiesto en una primera inspección de los mismos (apartado 4.1.2). Hay que tener presente que la mayoría de las pequeñas discrepancias observadas se explican porque el E-test suministra valores intermedios (mas precisos) entre las diluciones dobladas del método de las diluciones en agar. La ecuación de la recta de regresión sería la siguiente:

$$\text{Log}_{10}\text{CMI Agar} = 1.004 \times \text{Log}_{10}\text{CMI E-test} - 0.008$$

Esta ecuación, que corresponde a una recta muy próxima al origen de coordenadas y con un ángulo de casi 45° indica la similitud de los valores de CMI obtenidos por ambos métodos.

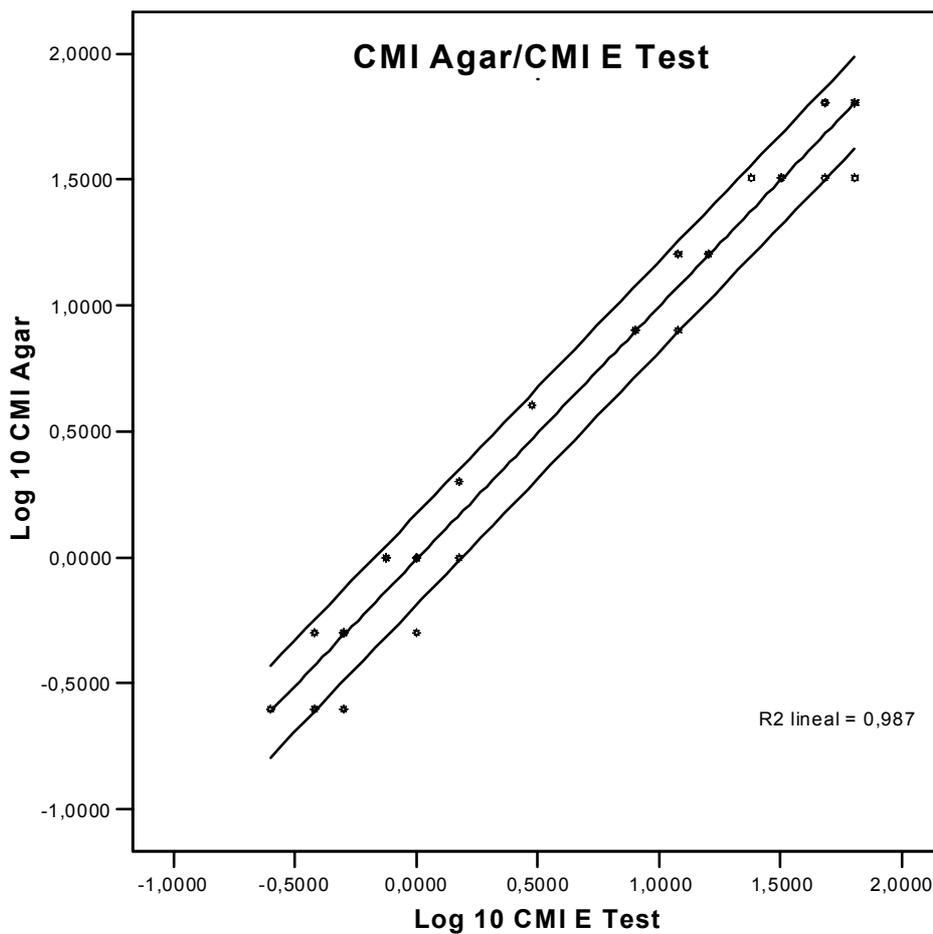


Figura R1. Comparación de los valores de CMI para gentamicina por los métodos de dilución en agar y E-test.

Tabla R4. Análisis estadístico de la comparación de CMI para gentamicina, por dilución en agar (CMI Agar) y por E-test (CMI E-test)

Resumen del modelo					
Modelo	R	R2	R2 corregida	Desviación típica	
1	0.993 (a)	0.987	0.986	0.10766	

Análisis de varianza (ANOVA)						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
1	Regresión	66.73	1	66.73	5757.67	< 0.001 (a)
	Residual	0.904	78	0.012	4	
	Total	67.64	79			

Coeficientes de regresión						
Modelo		Coeficientes			t	Significación
		No estandarizados		Estandarizados		
		B	Desviación típica	Beta		
1	Constante	-0,008	0.015		-0,575	0.567
	Log ₁₀ CMI E-test	1.004	0.013	0.993	75.88	< 0.001

VARIABLES predictoras: (Constante), Log₁₀ CMI E-test

VARIABLE dependiente: Log₁₀ CMI Agar

4.3.2. Influencia del medio de cultivo y la temperatura de incubación sobre los valores de CM0.

Para estas comparaciones, de las que se ha hecho una primera interpretación al final del apartado 4.2, se tomaron como referencia los valores de CM0 obtenidos en

Agar Mueller-Hinton a 35°C (CM0 MHA 35), y todos los obtenidos en otras condiciones se compararon con ellos. La **Figura R2** corresponde a la comparación con los valores obtenidos en Agar-sangre a 35°C (CM0 AS 35). El análisis estadístico, en la **Tabla R5**, ofreció unos parámetros indicativos del excelente ajuste de los puntos a la recta de regresión ($R = 0.996$). La ecuación obtenida fue la siguiente:

$$\text{Log}_{10}\text{CM0 MHA 35} = 1.005 \times \text{Log}_{10}\text{CM0 AS 35} - 0.004$$

Al igual que en el caso anterior, se trata de una recta que pasa muy próxima al origen de coordenadas y forma ángulos de casi 45°, revelando la práctica identidad entre los valores obtenidos en uno y otro medio.

La comparación entre los valores de CM0 MHA 35 y los obtenidos en el mismo medio a 30°C (CM0 MHA 30) se representa en la **Figura R3**. Los correspondientes parámetros estadísticos están en la **Tabla R6**. El valor de R (0.991) sigue siendo próximo a 1, indicando que los puntos se sitúan próximos a la recta de regresión. La ecuación fue la siguiente:

$$\text{Log}_{10}\text{CM0 MHA 35} = 1.045 \times \text{Log}_{10}\text{CM0 MHA 30} - 0.031$$

Se trata de una recta, de similares características a las anteriores, por lo que los valores de CM0 obtenidos a 35 y 30°C fueron casi idénticos.

Finalmente, la **Figura R4** presenta la comparación entre CM0 MHA 35 y los valores obtenidos cambiando de medio y de temperatura (CM0 AS 30). Los parámetros mostrados en la **Tabla R7** revelaron el excelente ajuste de la recta de regresión ($R = 0.986$), definida por la siguiente ecuación:

$$\text{Log}_{10}\text{CM0 MHA 35} = 1.047 \times \text{Log}_{10}\text{CM0 AS 30} - 0.007$$

Por tanto, tampoco la conjunción de ambos factores, temperatura de incubación y medio de cultivo, introdujo diferencias significativas en los valores de CM0.

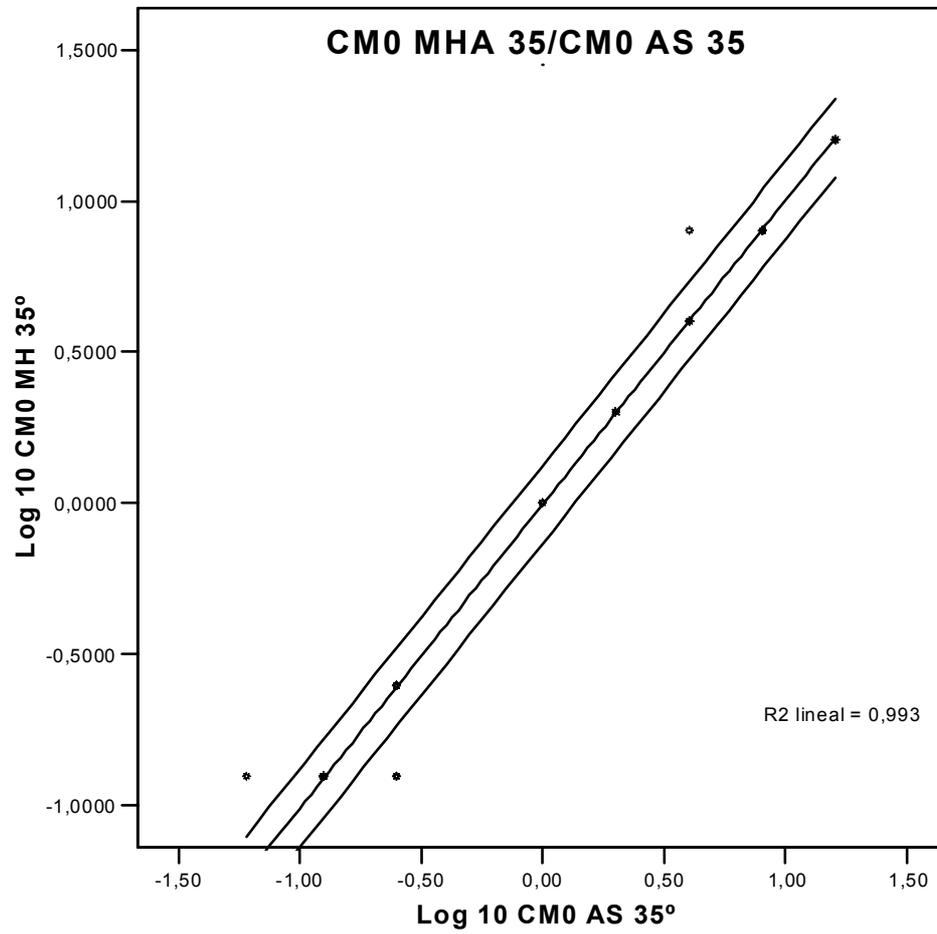


Figura R2. Comparación de valores de CM0 en Agar Mueller-Hinton a 35°C (CM0 MHA 35) y Agar-sangre a 35°C (CM0 AS 35).

Tabla R5. Análisis estadístico de la comparación de CM0 para gentamicina, a 35°C, en Agar Mueller-Hinton (CM0 MHA 35) y Agar-sangre (CM0 AS 35).

Resumen del modelo						
Modelo	R	R2	R2 corregida	Desviación típica		
1	0.996 (a)	0.993	0.992	0.076899		

Análisis de varianza (ANOVA)						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
1	Regresión	61.699	1	61.699	10433.6	< 0.001 (a)
	Residual	0.461	78	0.006	71	
	Total	62.16	79			

Coeficientes de regresión						
Modelo		Coeficientes			t	Significación
		No estandarizados		Estandarizados		
		B	Desviación típica	Beta		
1	Constante	-0,004	0.009		-0,409	0.683
	Log ₁₀ CMI E-test	1.005	0.010	0.996	102.145	< 0.001

Variables predictoras: (Constante), Log₁₀ CM0 AS 35

Variable dependiente: Log₁₀ CM0 MHA 35

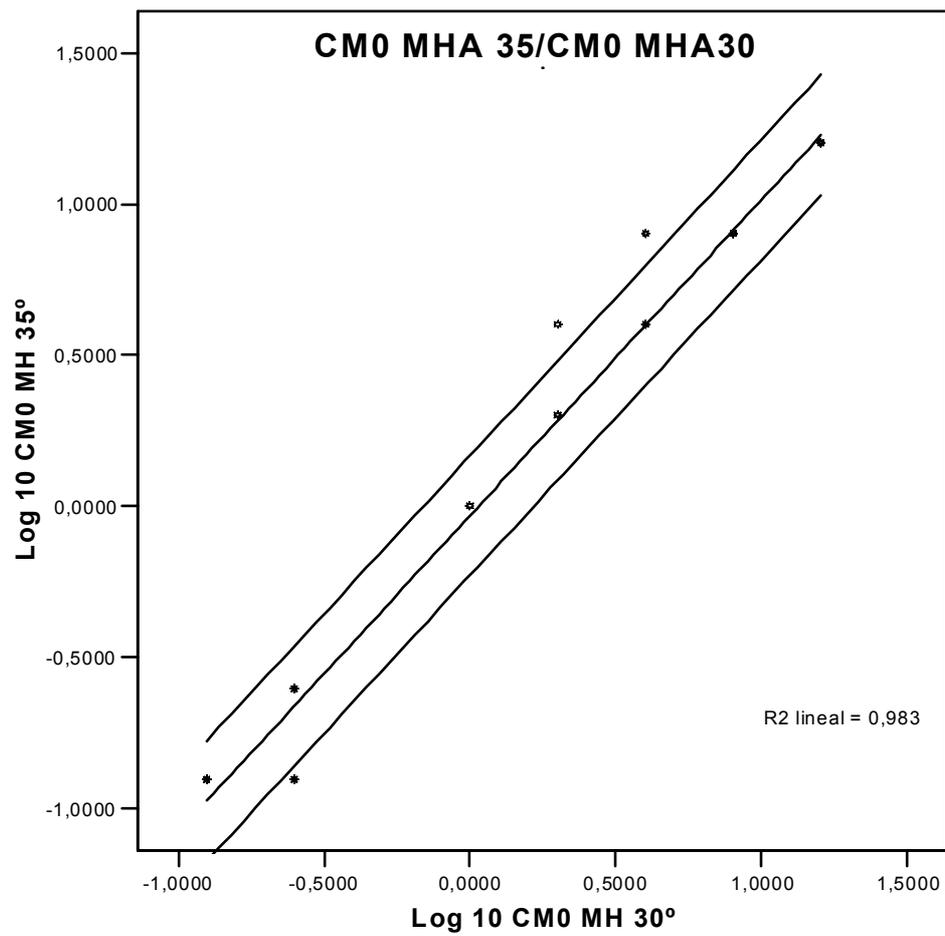


Figura R3. Comparación de valores de CM0 en Agar Mueller-Hinton a 35°C (CM0 MHA 35) y a 30°C (CM0 MHA 30).

Tabla R6. Análisis estadístico de la comparación de CM0 para gentamicina, en Agar Mueller-Hinton, a 35°C (CM0 MHA 35) y 30°C (CM0 MHA 30).

Resumen del modelo				
Modelo	R	R2	R2 corregida	Desviación típica
1	0.991 (a)	0.983	0.982	0.11791

Análisis de varianza (ANOVA)						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
1	Regresión	61.076	1	61.076	4393.16	< 0.001 (a)
	Residual	1.084	78	0.014		
	Total	62.16	79			

Coeficientes de regresión					
Modelo	Coeficientes			t	Significación
	No estandarizados		Estandarizados		
1	B	Desviación típica	Beta		
Constante	-0,031	0.013		-2,359	0.021
Log ₁₀ CMI E-test	1.045	0.016	0.991	66.281	< 0.001

VARIABLES predictoras: (Constante), Log₁₀ CM0 MHA 30

VARIABLE dependiente: Log₁₀ CM0 MHA 35

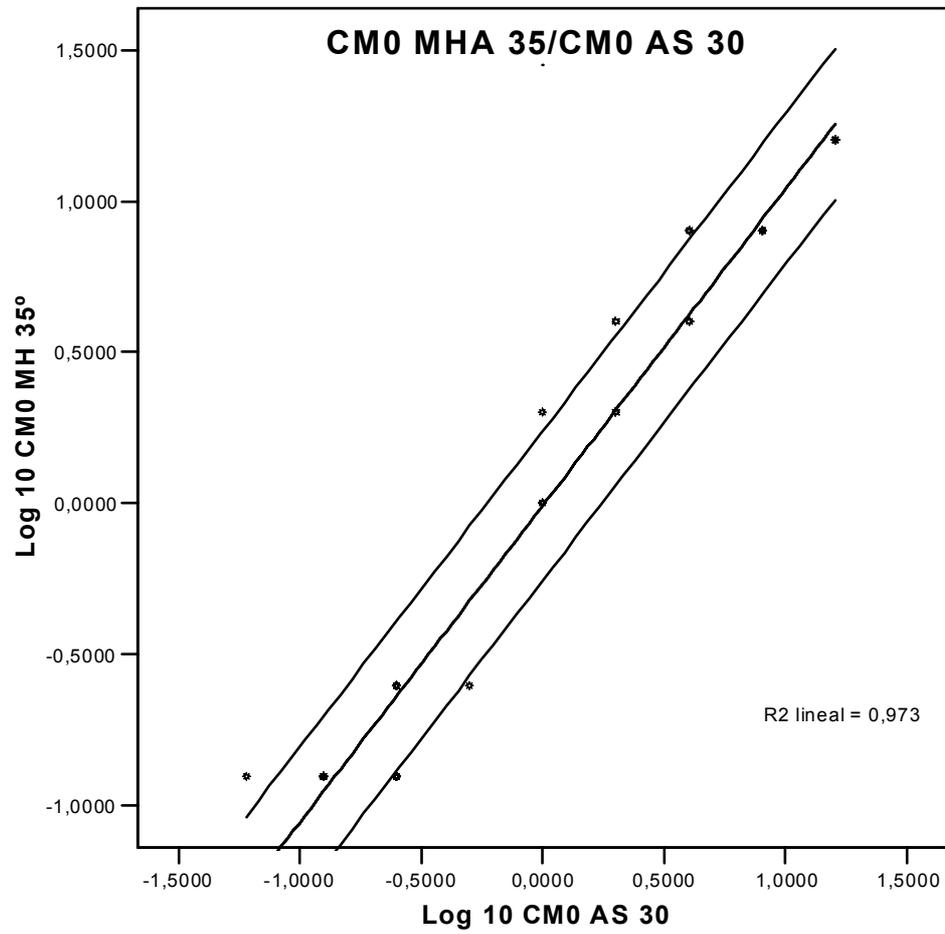


Figura R4. Comparación de valores de CM0 en Agar Mueller-Hinton a 35°C (CM0 MHA 35) y Agar-sangre 30°C (CM0 AS 30).

Tabla R7. Análisis estadístico de la comparación de CM0 para gentamicina, en Agar Mueller-Hinton, a 35°C (CM0 MHA 35) y Agar-sangre a 30°C (CM0 AS 30).

Resumen del modelo					
Modelo	R	R2	R2 corregida	Desviación típica	
1	0.986 (a)	0.973	0.972	0.14747	

Análisis de varianza (ANOVA)						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
1	Regresión	60.464	1	60.464	2780.06	< 0.001 (a)
	Residual	1.696	78	0.022		
	Total	62.16	79			

Coeficientes de regresión						
Modelo	Coeficientes			t	Significación	
	No estandarizados		Estandarizados			
	B	Desviación típica	Beta			
1	Constante	-0,007	0.016		-0,442	0.659
	Log ₁₀ CMI E-test	1.047	0.020	0.986	52.726	< 0.001

Variables predictoras: (Constante), Log₁₀ CM0 AS 30

Variable dependiente: Log₁₀ CM0 MHA 35

4.3.3. Determinación de los valores de corte para CM0.

Tal como se ha indicado en el apartado 3.8, la intersección entre las rectas que parten de los valores de corte de CMI (eje de ordenadas) y las bandas de aceptación de valores para la relación CMI/CM0, deben localizar los puntos de corte para valores de carga en disco que cumplan con los criterios expuestos en la **Tabla M7**. En el caso de la gentamicina, la relación entre valores de CMI y CM0 (en Agar Mueller-Hinton, a 35°C), así como la resolución gráfica de los valores de corte se presenta en la **Figura R5**.

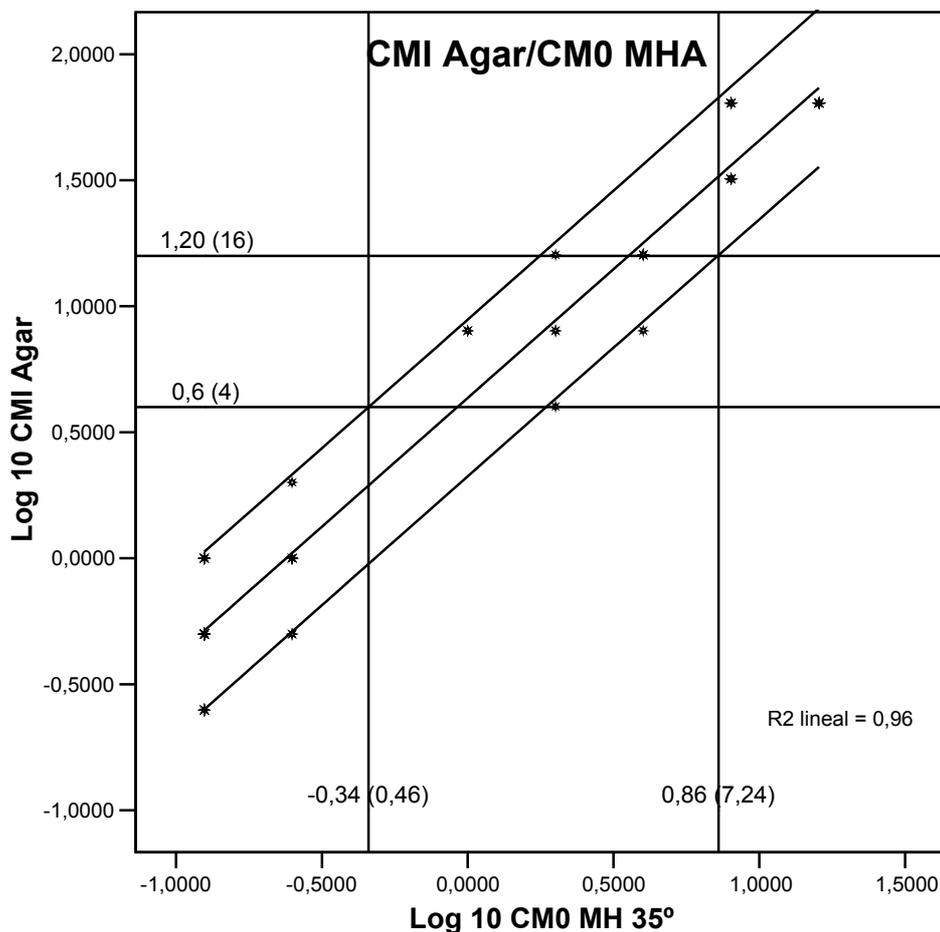


Figura R5. Determinación de los valores de corte de gentamicina a través la relación estadística entre CMI por el método de dilución en agar (CMI Agar) y CM0 en Agar Muller-Hinton a 35°C (CM0 MH 35°).

La **Tabla R8** presenta los correspondientes parámetros estadísticos. Los valores de R y R², próximos a la unidad, indicaron un buen ajuste de la regresión y un excelente valor de predicción. El análisis de coeficientes de regresión definió la siguiente fórmula para la recta obtenida con los valores de CMI y CM0 en escala logarítmica:

$$\text{Log}_{10}\text{CMI Agar} = 1.022 \times \text{Log}_{10}\text{CM0 MH 35} + 0.636$$

Tabla R8. Análisis estadístico para la determinación de los valores de corte de gentamicina a través la relación entre CMI por el método de dilución en agar (CMI Agar) y CM0 en Agar Muller-Hinton a 35°C (CM0 MH 35°).

Resumen del modelo

Modelo	R	R Cuadrado	R2 Corregida	Desviación típica
1	0.980(a)	0.960	0.960	0.185597

Análisis de varianza(ANOVA)

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
1	Regresión	64.950	1	64.950	1885.54	< 0.001(a)
	Residual	2.687	78	0.034		
	Total	67.637	79			

Coefficientes de regresión

Modelo	Coeficientes			t	Significación	
	No estandarizados		Estandarizados			
	B	Desviación típica	Beta			
1						
	Constante	0.636	0.021		30.653	0.000
	Log10 CM0 MH 35°	1.022	0.024	0.980	430423	0.000

Variabes predictoras: (constante),Log10 CM0 MH 35°

Variabes dependientes: Log10 CMI agar

Esta ecuación equivale a la siguiente expresión exponencial, una vez eliminados los logaritmos:

$$\text{CMI} = 4.33 \times \text{CM0}^{1.022}$$

En este caso no se trata de una recta de las características de las obtenidas en la comparaciones de CMI por distintos métodos o en el estudio de la influencia del medio y la temperatura en la CM0, lo que era de esperar, ya que en este caso se están comparando conceptos diferentes; pero está claro que, entre ellos, hay una muy buena correlación lineal y que, conocido el valor de una de las magnitudes, es posible calcular el de la otra con un excelente nivel de predicción.

De acuerdo con el análisis estadístico, los valores de corte calculados (**Tabla R9**) debieran servir para definir la cualidad de resistente, intermedia o sensible de una cepa de enterobacteria frente a la gentamicina, simplemente examinando la existencia o no de halos de inhibición, sin necesidad de medir el diámetro de los mismos. Esta capacidad de predicción se evaluará en la segunda parte de la presente Tesis.

Tabla R9. Valores de corte para CMI y CM0 de gentamicina.

Calificación de la cepa	Corte CMI* (µg/ml)	Corte CM0 ^b : presencia de halo para los valores que se indican (µg/disco)	
		0.46	7.24
Sensible	≤ 4	Si	Si
Intermedia	8	No	Si
Resistente	≥ 16	No	No

*Valores de CMI de la cepa problema

4.4. DETERMINACIONES DE CMI PARA CIPROFLOXACINO.

4.4.1. Determinaciones con cepas patrón.

Como se indicó en el apartado 4.1.1, en las determinaciones de CMI se incluyeron tres cepas patrón, cuyos valores para ciprofloxacino se presentan en la **Tabla R10**. Se observa que el espectro de resultados obtenidos en las distintas determinaciones quedó siempre incluido dentro del rango aceptable según la NCCLS.

Tabla R10. Valores de CMI de ciprofloxacino para cepas patrón

Cepa	Rango estándar (NCCLS) en µg/ml	Valores hallados (µg/ml)	
		Dilución en agar *	E-test
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.25 - 1	0.5	0.25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.004 - 0.016	≤ 0.03	0.012
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.12 - 0.5	0.25 , 0.5	0.38

* Para cada cepa se realizó un mínimo de 4 determinaciones; se indican el o los valores obtenidos en todas ellas.

4.4.2. Determinaciones con aislados clínicos de enterobacterias.

En la **Tabla R11** se muestran los valores de CMI obtenidos aplicando los métodos de dilución en agar y E-test a 91 cepas de enterobacterias, así como la calificación de resistente, intermedia o sensible según el sistema Wider. Las 27 discrepancias observada entre los valores de CMI hallados por ambos métodos fueron siempre iguales o inferiores a una dilución doblada, de las utilizadas en el método de dilución en agar, lo que, como ya se ha indicado, se explica por la mayor precisión del E-test, que utiliza valores intermedios. El correspondiente análisis estadístico se presenta en la **Figura R6** (apartado 4.6.1).

Tabla R11. Valores de CMI de ciprofloxacino para aislados clínicos de enterobacterias.

Cepa			Sistema Wider		CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
Número	Referencia	Identificación	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Categoría	Dilución en agar	E-test
1	25938	<i>Escherichia coli</i>	> 4	R	64	> 32
2	25387	<i>E. coli</i>	> 4	R	8	8
3	25598	<i>E. coli</i>	> 4	R	8	8
4	25919	<i>E. coli</i>	1	S	0.5	0.38
5	25582	<i>Salmonella arizone</i>	> 4	R	16	16
6	25609	<i>Proteus mirabilis</i>	1	S	1	1
7	26111	<i>E. coli</i>	> 4	R	16	16
8	26206	<i>Salmonella spp.</i>	1	S	0.25	0.19
9	26224	<i>E. coli</i>	1	S	0.25	0.25
10	26421	<i>E. coli</i>	> 4	R	64	> 32
11	26354	<i>E. coli</i>	> 4	R	64	> 32
12	26832	<i>E. coli</i>	> 4	R	32	> 32
13	26614	<i>E. coli</i>	> 4	R	64	> 32
14	27241	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 4	R	16	12
15	27056	<i>E. coli</i>	1	S	0.25	0.19
16	27050	<i>E. coli</i>	> 4	R	32	> 32
17	27818	<i>E. coli</i>	> 4	R	32	> 32
18	28595	<i>E. coli</i>	> 4	R	32	> 32
19	28341	<i>E. coli</i>	> 4	R	8	8
20	28924	<i>Serratia plymuthica</i>	≤ 0.12	S	0.125	0.125
21	28937	<i>E. coli</i>	> 4	R	32	> 32
22	28886	<i>E. coli</i>	1	S	1	1
23	29174	<i>E. coli</i>	1	S	0.25	0.25
24	29574	<i>E. coli</i>	1	S	0.25	0.19
25	29506	<i>E. coli</i>	2	I	2	2
26	29081	<i>E. coli</i>	> 4	R	64	> 32
27	29377	<i>K. pneumoniae</i>	> 4	R	4	4
28	29491	<i>E. coli</i>	1	S	1	0.5
29	29640	<i>E. coli</i>	> 4	R	64	> 32
30	29751-2	<i>E. coli</i>	> 4	R	8	6
31	29836	<i>E. coli</i>	1	S	0.25	0.25
32	29932	<i>E. coli</i>	> 4	R	64	> 32
33	30564	<i>E. coli</i>	> 4	R	16	16
34	30118	<i>E. coli</i>	1	S	0.25	0.25
35	31532	<i>Enterobacter cloacae</i>	> 4	R	64	> 32
36	31408	<i>E. coli</i>	> 4	R	16	16
37	33254	<i>Serratia marcescens</i>	≤ 0.12	S	0.125	0.125
38	33785	<i>S. marcescens</i>	≤ 0.12	S	0.125	0.125
39	33859	<i>E. coli</i>	> 4	R	64	> 32
40	33834	<i>E. coli</i>	1	S	0.25	0.25

Tabla R11. (Continuación)

Cepa			Sistema Wider		CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
Número	Referencia	Identificación	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Categoría	Dilución en agar	E-test
41	34038	<i>E. coli</i>	> 4	R	64	> 32
42	36210	<i>E. coli</i>	> 4	R	8	8
43	36241	<i>P. mirabilis</i>	> 4	R	16	16
44	38699	<i>E. coli</i>	> 4	R	8	8
45	40805	<i>E. coli</i>	> 4	R	64	> 32
46	41111	<i>E. coli</i>	> 4	R	8	12
47	41994	<i>E. coli</i>	> 4	R	8	8
48	41070	<i>E. coli</i>	> 4	R	16	16
49	44496	<i>E. coli</i>	> 4	R	32	> 32
50	44614	<i>E. coli</i>	> 4	R	32	> 32
51	44474	<i>E. coli</i>	> 4	R	64	> 32
52	45192	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 0.12	S	0.125	0.125
53	45355	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	0.125	0.125
54	45356	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	0.125	0.125
55	45179	<i>E. coli</i>	> 4	R	64	> 32
56	45168	<i>E. coli</i>	> 4	R	8	8
57	45877	<i>E. coli</i>	> 4	R	8	8
58	46905	<i>E. coli</i>	> 4	R	32	> 32
59	46863	<i>E. coli</i>	> 4	R	16	16
60	46136	<i>Morganella morganii</i>	> 4	R	4	3
61	46694	<i>E. coli</i>	> 4	R	16	16
62	46698	<i>E. coli</i>	> 4	R	16	16
63	46821	<i>E. coli</i>	> 4	R	64	> 32
64	47196	<i>E. coli</i>	> 4	R	32	> 32
65	47870	<i>K. pneumoniae</i>	2	I	1	1
66	47929	<i>K. pneumoniae</i>	1	S	0.5	0.5
67	48020	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	I	2	2
68	49551	<i>E. coli</i>	1	S	0.25	0.25
69	49968	<i>E. coli</i>	> 4	R	8	8
70	49527	<i>E. coli</i>	> 4	R	32	32
71	50186	<i>K. pneumoniae</i>	> 4	R	4	3
72	50249	<i>E. coli</i>	> 4	R	16	16
73	50867	<i>Salmonella spp.</i>	1	S	0.125	0.125
74	50807	<i>E. coli</i>	> 4	R	16	32
75	50724	<i>E. coli</i>	> 4	R	64	> 32
76	51003	<i>E. coli</i>	> 4	R	16	32
77	51469	<i>E. coli</i>	> 4	R	16	16
78	51638	<i>P. mirabilis</i>	4	R	2	4
79	51627	<i>E. coli</i>	> 4	R	32	> 32
80	51651	<i>E. coli</i>	> 4	R	8	12

Tabla R11. (Continuación)

Cepa			Sistema Wider		CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
Número	Referencia	Identificación	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Categoría	Dilución en agar	E-test
81	51862	<i>Salmonella spp.</i>	1	S	0.125	0.125
82	51910	<i>K. pneumoniae</i>	2	I	2	2
83	52159	<i>E. coli</i>	> 4	R	64	> 32
84	7098	<i>E. coli</i>	> 4	R	64	> 32
85	8042	<i>E. coli</i>	1	S	0.5	0.5
86	6995	<i>K. pneumoniae</i>	> 4	R	16	16
87	7285	<i>K. pneumoniae</i>	1	S	0.5	0.75
88	3690	<i>Salmonella spp.</i>	1	S	0.125	0.125
89	3639	<i>K. pneumoniae</i>	> 4	R	16	16
90	4098	<i>E. coli</i>	1	S	0.5	0.38
91	3873	<i>E. coli</i>	> 4	R	16	12

Según establece la NCCLS, valores de CMI $\geq 4 \mu\text{g}$ de ciprofloxacino por ml corresponden a cepas resistentes; valores de CMI = $2 \mu\text{g/ml}$ definen cepas intermedias; y las CMI $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ corresponden a cepas sensibles. El sistema Wider usó concentraciones de 0.12, 1, 2 y $4 \mu\text{g/ml}$, con el mismo criterio de interpretación que el NCCLS. Según este sistema, de las 91 cepas ensayadas, 61 (67%) fueron resistentes, 4 (4.4%) intermedias y 26 (28.6%) sensibles. Se registraron 4 discrepancias con las determinaciones de CMI, de las cuales 2 fueron aparentes: las cepas 60 y 71 fueron resistentes según Wider y CMI por dilución en agar (CMI = 4), pero el valor dado por el E-test (CMI = 3) quedaba entre los cortes para resistentes e intermedias; ello se debe a la mayor precisión del E-test y, por tanto, no plantea un problema real: ambas cepas deben clasificarse como resistentes. Por el contrario, la cepa 65 fue intermedia según Wider pero sensible según los valores de CMI por dilución en agar y E-test; y la cepa 78, resistente por Wider y E-test (CMI = 4), fue intermedia por dilución en agar (CMI = 2).

4.5. DETERMINACIONES DE CARGA CRÍTICA (CM0) PARA CIPROFLOXACINO.

Siguiendo el mismo plan de trabajo que para la gentamicina, se llevaron a cabo determinaciones de CM0 para ciprofloxacino en Agar Mueller-Hinton y Agar-sangre, a 35°C y 30°C, e incluyendo un disco comercial, con 5 µg de ciprofloxacino, como referencia, para medir el diámetro del halo de inhibición.

Las medidas se realizaron sobre las 91 cepas de enterobacterias cuyos valores de CMI habían sido previamente establecidos. Los resultados se presentan en la **Tabla R12**. Según el criterio de la NCCLS, diámetros de halo ≤ 15 mm corresponden a cepas resistentes, de 16 a 20 mm son de cepas intermedias y ≥ 21 definen cepas sensibles. Con este criterio, 65 cepas (71.4%) fueron resistentes, 10 (11%) intermedias y 16 (17.6%) sensibles. La comparación, cepa por cepa, con los resultados obtenidos del sistema Wider (**Tabla R11**), revela que un total de 10 cepas (identificadas con los números 4, 6, 9, 22, 28, 31, 66, 85, 87 y 90), calificadas de sensibles por el Wider, pasaron a intermedias de acuerdo con los diámetros de halo de inhibición. Por el contrario, 4 cepas (números 25, 65, 67 y 82) que el Wider clasificó como intermedias, fueron resistentes según sus diámetros de halo. En ningún caso una cepa calificada como sensible por Wider pasó a resistente por su tamaño de halo de inhibición, ni tampoco ocurrió lo contrario. Sin embargo, de las 14 cepas discrepantes, una (la cepa 65) tuvo un comportamiento muy problemático, ya que los valores de CMI por los métodos de dilución en agar y E-test correspondieron a la categoría de sensible. En los otros casos de discrepancia entre tamaño de halo por difusión en agar y Wider, hubo homogeneidad entre los datos de este último y los valores de CMI por los otros dos métodos.

La anteriormente mencionada relación inversa entre tamaños de halo de inhibición y valores de CM0 se mantuvo, en términos generales, en todos los casos. Adicionalmente, los datos presentados en la **Tabla R12** no revelaron ninguna influencia del medio o la temperatura, ya que las diferencias encontradas para una misma cepa no fueron nunca mayores de una dilución de antibiótico. Los correspondientes análisis estadísticos se comentan en el apartado 4.6.2.

Tabla R12. Valores de CM0 y halos de inhibición de ciprofloxacino para aislados clínicos de enterobacterias.

Número	Cepa		CM0 (µg)*				Diámetro de halo (mm) para 5 µg
	Referencia	Identificación	AMH 35°C	AS 35°C	AMH 30°C	AS 30°C	
1	25938	<i>Escherichia coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
2	25387	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	9
3	25598	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	7
4	25919	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	20
5	25582	<i>Salmonella arizone</i>	2	2	2	2	7
6	25609	<i>Proteus mirabilis</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	16
7	26111	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	7
8	26206	<i>Salmonella spp.</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	22
9	26224	<i>E. coli</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	20
10	26421	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
11	26354	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
12	26832	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
13	26614	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
14	27241	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2	2	2	8
15	27056	<i>E. coli</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	23
16	27050	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
17	27818	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
18	28595	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	0
19	28341	<i>E. coli</i>	2	1	1	1	7
20	28924	<i>Serratia plymuthica</i>	0.015	0.015	0.015	0.015	26
21	28937	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	0
22	28886	<i>E. coli</i>	0.25	0.25	0.125	0.125	18
23	29174	<i>E. coli</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	21
24	29574	<i>E. coli</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	21
25	29506	<i>E. coli</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	14
26	29081	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	0
27	29377	<i>K. pneumoniae</i>	1	1	1	1	9
28	29491	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	19
29	29640	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
30	29751-2	<i>E. coli</i>	1	1	1	1	9
31	29836	<i>E. coli</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	20
32	29932	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
33	30564	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	7
34	30118	<i>E. coli</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	21
35	31532	<i>Enterobacter cloacae</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
36	31408	<i>E. coli</i>	2	2	2	1	7
37	33254	<i>Serratia marcescens</i>	0.015	0.015	0.015	0.015	28
38	33785	<i>S. marcescens</i>	< 0.015	< 0.015	0.015	0.015	30
39	33859	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
40	33834	<i>E. coli</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	21

Tabla R12. (Continuación)

Número	Cepa		CM0 (µg)*				Diámetro de halo (mm) para 5 µg
	Referencia	Identificación	AMH 35°C	AS 35°C	AMH 30°C	AS 30°C	
41	34038	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	0
42	36210	<i>E. coli</i>	2	2	1	1	9
43	36241	<i>P. mirabilis</i>	2	2	2	2	7
44	38699	<i>E. coli</i>	2	2	1	1	7
45	40805	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
46	41111	<i>E. coli</i>	2	2	1	2	7
47	41994	<i>E. coli</i>	1	1	1	1	9
48	41070	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	7
49	44496	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	0
50	44614	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
51	44474	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
52	45192	<i>K. pneumoniae</i>	0.015	0.015	0.015	0.015	25
53	45355	<i>E. coli</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	22
54	45356	<i>E. coli</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	23
55	45179	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
56	45168	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	7
57	45877	<i>E. coli</i>	1	1	1	1	12
58	46905	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	0
59	46863	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	7
60	46136	<i>Morganella morganii</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	12
61	46694	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	7
62	46698	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	7
63	46821	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
64	47196	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	0
65	47870	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	15
66	47929	<i>K. pneumoniae</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	18
67	48020	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	13
68	49551	<i>E. coli</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	22
69	49968	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	7
70	49527	<i>E. coli</i>	4	4	4	4	0
71	50186	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	11
72	50249	<i>E. coli</i>	4	4	2	2	0
73	50867	<i>Salmonella spp.</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	21
74	50807	<i>E. coli</i>	4	4	4	4	0
75	50724	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
76	51003	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	0
77	51469	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	0
78	51638	<i>P. mirabilis</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	15
79	51627	<i>E. coli</i>	8	8	8	8	0
80	51651	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	7

Tabla R12. (Continuación)

Cepa			CM0 (µg)*				Diámetro de halo (mm) para 5 µg
Número	Referencia	Identificación	AMH 35°C	AS 35°C	AMH 30°C	AS 30°C	
81	51862	<i>Salmonella spp.</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	23
82	51910	<i>K. pneumoniae</i>	0.25	0.25	0.25	0.25	13
83	52159	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
84	7098	<i>E. coli</i>	> 16	> 16	> 16	> 16	0
85	8042	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	18
86	6995	<i>K. pneumoniae</i>	2	2	2	2	7
87	7285	<i>K. pneumoniae</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	17
88	3690	<i>Salmonella spp.</i>	0.03	0.03	0.03	0.03	22
89	3639	<i>K. pneumoniae</i>	4	4	4	4	0
90	4098	<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	17
91	3873	<i>E. coli</i>	2	2	2	2	8

* Valores de carga crítica obtenidos en Agar Mueller-Hinton (AMH) y Agar-sangre (AS) a 35 y 30°C.

4.6. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE CORTE PARA CARGA CRÍTICA DE CIPROFLOXACINO.

4.6.1. Comparación de los valores de CMI obtenidos por dilución en agar y por E-test.

En la **Figura R6** se comparan los valores logarítmicos de CMI obtenidos por los métodos de dilución en agar y E-Test. El análisis estadístico de esta comparación está en la **Tabla R13**. El valor de R fue 0.993, consecuencia de una buena proximidad de los puntos a la recta de regresión. El valor de R² corregido (0.986) indica una excelente capacidad de predicción de los datos de CMI por dilución en agar a partir de los obtenidos por E-test. El ANOVA confirmó que la regresión se acepta como significativa. La ecuación de la recta de regresión indica la excelente correlación entre ambos métodos:

$$\text{Log}_{10}\text{CMI agar} = 0.978 \times \text{Log}_{10}\text{CMI E-test} + 0.016$$

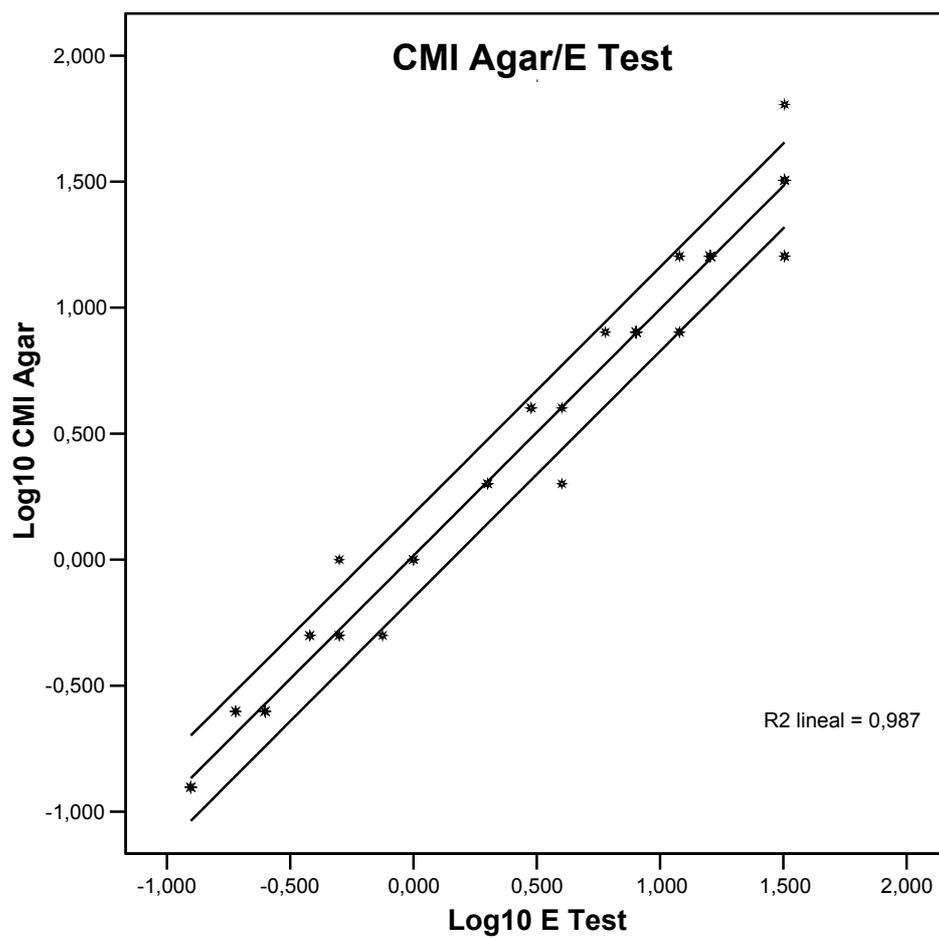


Figura R6. Comparación de los valores de CMI para ciprofloxacino por los métodos de dilución en agar y E-test.

Tabla R13. Análisis estadístico para la comparación de los valores de CMI para ciprofloxacino por los métodos de dilución en agar (CMI Agar) y E-test (CMI E-test).

Resumen del modelo

Modelo	R	R Cuadrado	R Cuadrado Corregida	Desviación típica
1	0.993(a)	0.987	0.986	0.99123

Análisis de varianza(ANOVA)

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
1	Regresión	49.478	1	49.478	5035.75	< 0.001(a)
	Residual	0.668	78	0.10		
	Total	50.146	79			

Coefficientes de regresión

Modelo	Coefficientes			t	Significación
	No estandarizados		Estandarizados		
	B	Desviación típica	Beta		
1	Constante	0.016	0.013	1.166	0.248
	Log10 CM0 MH 35°	0.978	0.014	0.993	70.963

VARIABLES predictoras: (constante),Log10 E-test.

VARIABLES dependientes: Log10 CMI agar.

4.6.2. Influencia del medio de cultivo y la temperatura de incubación sobre los valores de CM0.

Como en el caso de la gentamicina, los valores de CM0 obtenidos en Agar-Mueller Hinton a 35°C se tomaron como referencia. La primera comparación, entre CM0 MHA 35 y CM0 AS 35, se representa en la **Fig. R7**, acompañada de su análisis estadístico (**Tabla R14**). La gran proximidad de los puntos a la recta de regresión se manifiesta gráficamente por la proximidad de las bandas de aceptación, y

numéricamente por el valor de R, que fue 0.999. La correspondiente ecuación, revela la ausencia de influencia del medio:

$$\text{Log}_{10}\text{CM0 MHA} = 1.002 \times \text{Log}_{10}\text{CM0 AS 35} + 0.005$$

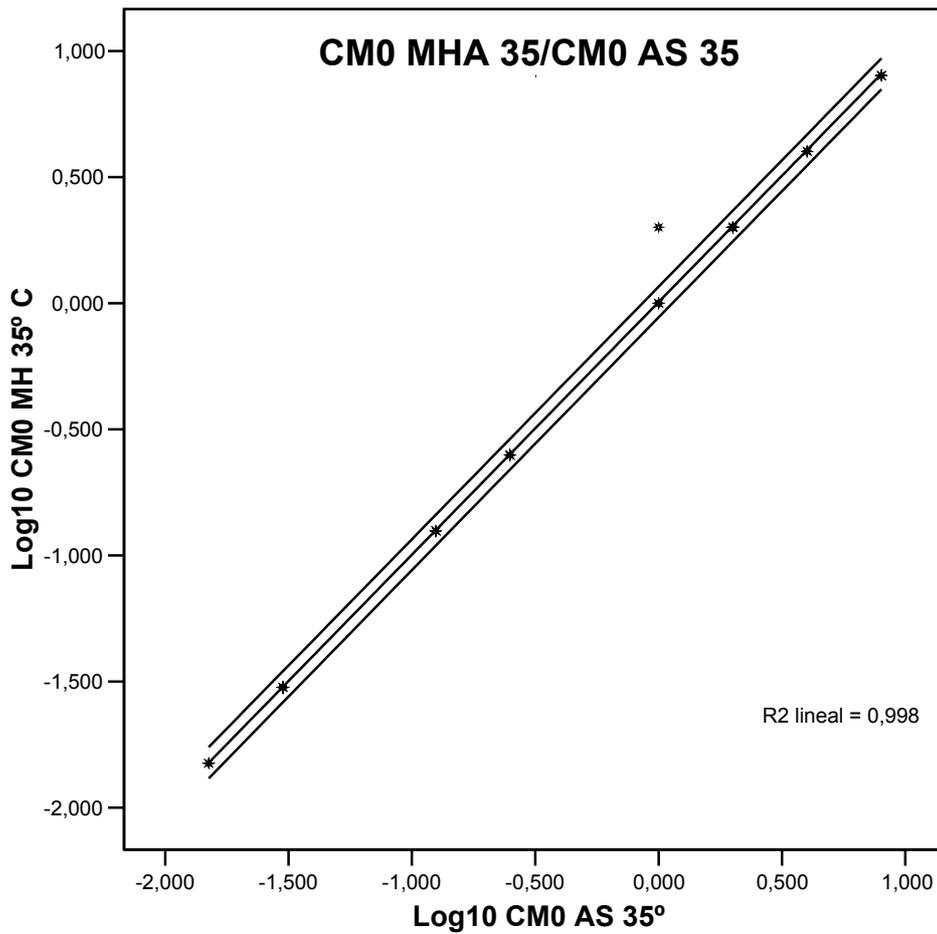


Figura R7. Comparación de valores de CM0 para ciprofloxacino en Agar Mueller-Hinton a 35°C (CM0 MHA 35) y Agar-sangre a 35°C (CM0 AS 35).

Tabla R14. Análisis estadístico para la comparación de los valores de CM0 para ciprofloxacino, a 35°C, en Agar Muller-Hinton (CM0 MHA 35°) y Agar-sangre (CM0 AS 35°).

Resumen del modelo

Modelo	R	R Cuadrado	R Cuadrado Corregida	Desviación típica
1	0.999(a)	0.998	0.998	0.036211

Análisis de varianza(ANOVA)

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
1	Regresión	53.957	1	53.957	41.150.036	< 0.001(a)
	Residual	0.089	68	0.001		
	Total	54.046	69			

Coefficientes de regresión

Modelo	Coefficientes			t	Significación
	No estandarizados		Estandarizados		
	B	Desviación típica	Beta		
1	Constante	0.005	0.005	1.054	0.296
	Log10 CM0 MH 35°	1.002	0.005	0.999	202.855

VARIABLES predictoras: (constante),Log10 CM0 AS 35°.

VARIABLES dependientes: Log10 CM0 MH 35°.

Cuando se cambió la temperatura de incubación sin variar el medio (Agar Mueller-Hinton), tampoco se alteró la homogeneidad de los datos (**Figura R8**). La estadística en la **Tabla R15** ofrece un valor de 0.995 para R, con la siguiente ecuación:

$$\text{Log}_{10}\text{CM0 MHA 35} = 1.008 \times \text{Log}_{10}\text{CM0 MHA 30} + 0.028$$

Como en el caso anterior, es una recta que prácticamente coincide con la bisectriz del ángulo recto entre ambos ejes de coordenadas.

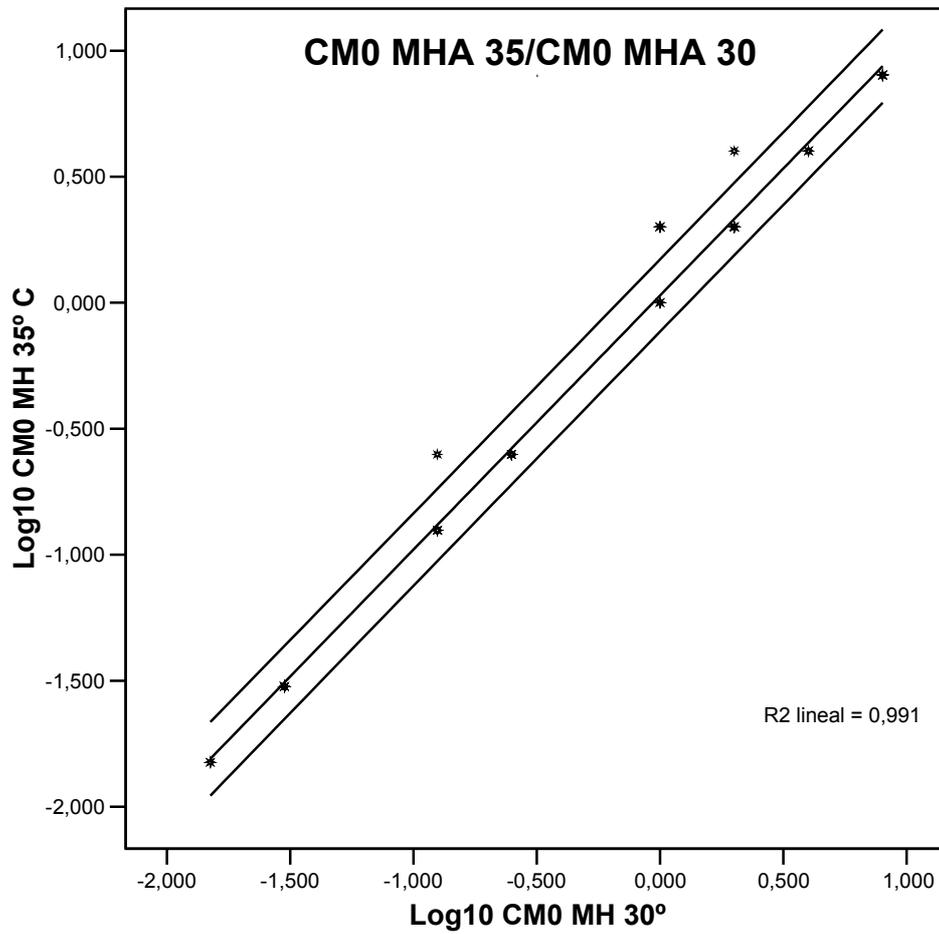


Figura R8. Comparación de valores de CM0 en Agar Mueller-Hinton a 35°C (CM0 MHA 35) y a 30°C (CM0 MHA 30).

Tabla R15. Análisis estadístico para la comparación de los valores de CM0 para ciprofloxacino, en Agar Muller-Hinton a 35°C (CM0 MHA 35°) y Agar Muller-Hinton a 30°C (CM0 AMH 30°).

Resumen del modelo

Modelo	R	R Cuadrado	R Cuadrado Corregida	Desviación típica
1	0.995(a)	0.991	0.991	0.085217

Análisis de varianza(ANOVA)

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
1	Regresión	53.552	1	53.552	7.374.319	< 0.001(a)
	Residual	0.494	68	0.007		
	Total	54.046	69			

Coefficientes de regresión

Modelo	Coefficientes			t	Significación
	No estandarizados		Estandarizados		
	B	Desviación típica	Beta		
1	Constante	0.028	0.011	2.607	0.011
	Log10 CM0 MH 35°	1.008	0.012	0.995	85.874

VARIABLES predictoras: (constante),Log10 CM0 MH 30°.

VARIABLES dependientes: Log10 CM0 MH 35°.

La **Figura R9** y la **Tabla R16** corresponden a la comparación de valores de CM0 en el caso de cambiar simultáneamente de medio y de temperatura de incubación. El valor de R fue 0.995. La ecuación es la siguiente:

$$\text{Log}_{10}\text{CM0 MHA } 35 = 1.008 \times \text{Log}_{10}\text{CM0 AS } 30 + 0.028$$

El cambio de ambos factores no indujo alteraciones apreciables en los valores de CM0.

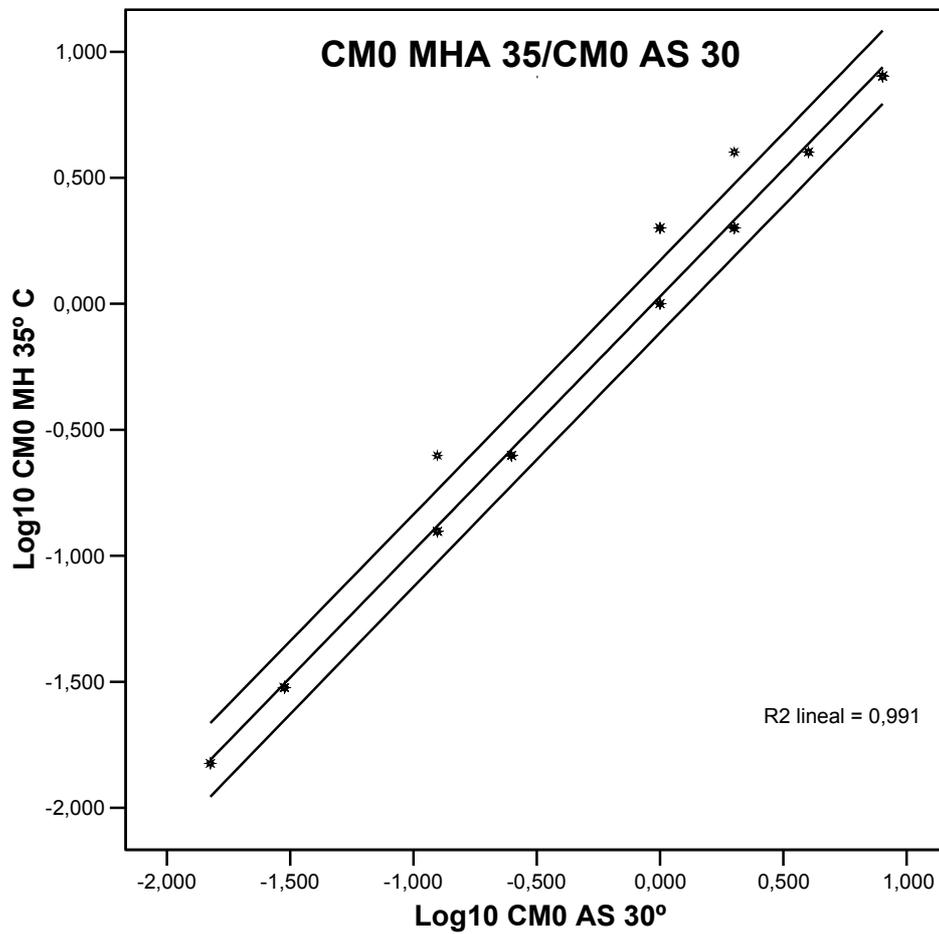


Figura R9. Comparación de valores de CM0 en Agar Mueller-Hinton a 35°C (CM0 MHA 35) y Agar-sangre 30°C (CM0 AS 30).

Tabla R16. Análisis estadístico para la comparación de los valores de CM0 para ciprofloxacino, en Agar Muller-Hinton a 35°C (CM0 MHA 35°) y Agar-sangre a 30°C (CM0 AS 30°).

Resumen del modelo

Modelo	R	R Cuadrado	R Cuadrado Corregida	Desviación típica
1	0.995(a)	0.991	0.991	0.085217

Análisis de varianza(ANOVA)

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
1	Regresión	53.552	1	53.552	7.374.319	< 0.001(a)
	Residual	0.494	68	0.007		
	Total	54.046	69			

Coefficientes de regresión

Modelo		Coefficientes			t	Significación
		No estandarizados		Estandarizados		
		B	Desviación típica	Beta		
1	Constante	0.028	0.011		2.607	0.011
	Log10 CM0 MH 35°	1.008	0.012	0.995	85.874	0.000

VARIABLES predictoras: (constante), Log10 CM0 AS 30°.

VARIABLES dependientes: Log10 CM0 MH 35°.

4.6.3. Determinación de los valores de corte para CM0.

La resolución gráfica de los valores de CM0 de ciprofloxacino que cumplan con los criterios de la **Tabla M7** se realizó de la misma manera que en el caso de la gentamicina, utilizando la relación entre los valores de CMI y CM0 obtenidos en Agar Mueller-Hinton a 35°C, que se presenta en la **Figura R10**. El análisis estadístico está en la **Tabla R17**.

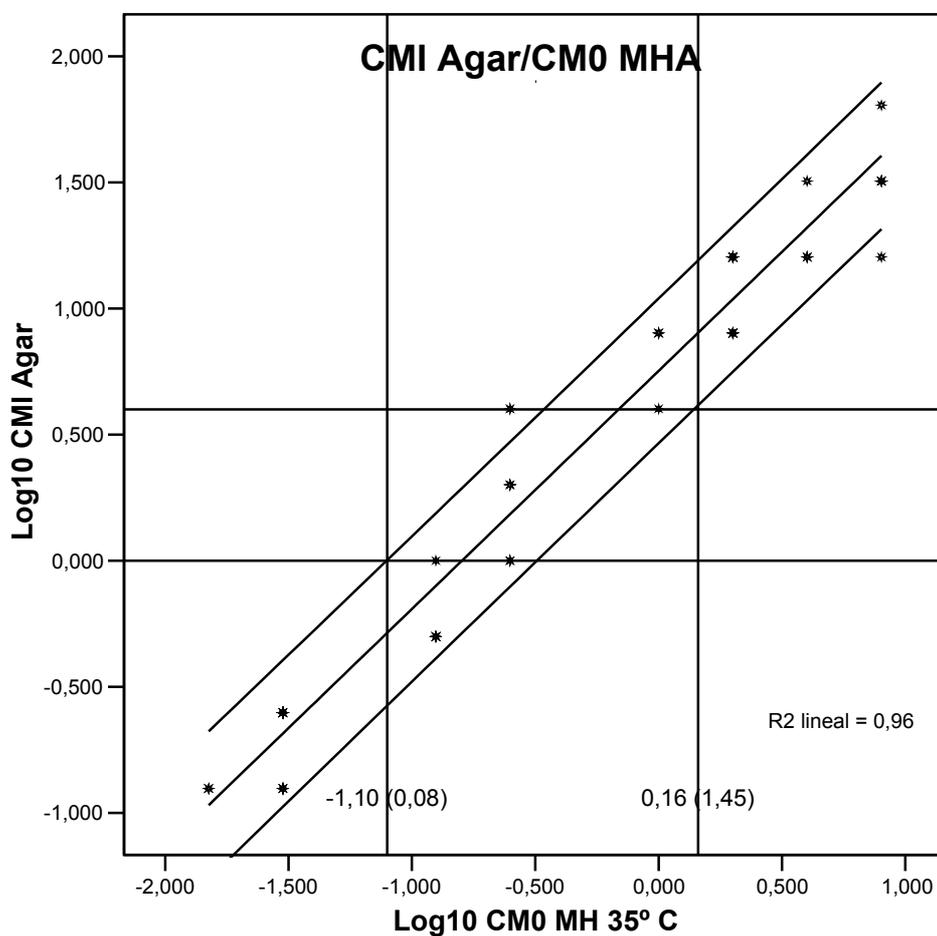


Figura R10. Determinación de los valores de corte de ciprofloxacino a través la relación estadística de CMI por el método de dilución en agar (CMI Agar) y CM0 en Agar Muller-Hinton a 35°C (CM0 MH 35°).

Tabla R17. Análisis estadístico para la determinación de los valores de corte de ciprofloxacino através la relación entre CMI por el método de dilución en agar (CMI Agar) y CM0 en Agar Muller-Hinton a 35°C (CM0 MH 35°).

Resumen del modelo

Modelo	R	R Cuadrado	R Cuadrado Corregida	Desviación típica
1	0.980(a)	0.960	0.960	0.170731

Análisis de varianza(ANOVA)

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
1	Regresión	48.164	1	48.164	1.652.333	< 0.001(a)
	Residual	1.982	68	0.029		
	Total	50.146	69			

Coefficientes de regresión

Modelo	Coefficientes			t	Significación
	No estandarizados		Estandarizados		
	B	Desviación típica	Beta		
1	Constante	0.753	0.022	34.842	0.000
	Log10 CM0 MH 35°	0.994	0.023	0.980	40.649

Variables predictoras: (constante),Log10 CM0 MH 35°

Variables dependientes: Log10 CMI agar

Como en el caso de la gentamicina, se encontró una excelente correlación entre ambos valores, definida por la ecuación siguiente:

$$\text{Log}_{10}\text{CMI Agar} = 0.944 \times \text{Log}_{10}\text{CM0 MH 35} + 0.753$$

Ecuación cuya forma exponencial es:

$$\text{CMI} = 5.66 \times \text{CM0}^{0.944}$$

Los valores de corte calculados se presentan en la **Tabla R18**.

Tabla R18. Valores de corte para CMI y CM0 de ciprofloxacino.

Calificación de la cepa	Corte CMI* (µg/ml)	Corte CM0 ^b : presencia de halo para los valores que se indican (µg/disco)	
		0.08	1.45
Sensible	≤ 1	Si	Si
Intermedia	2	No	Si
Resistente	≥ 4	No	No

*Valores de CMI de la cepa problema (criterios de NCCLS)

4.7. VALIDACIÓN DE LOS VALORES DE CORTE PARA CM0 DE GENTAMICINA.

4.7.1. Calificación de aislados clínicos según el sistema Wider, el método de difusión en agar desde disco y los valores de corte para CM0.

Para la validación de la técnica basada en el establecimiento de valores de corte para CM0 de gentamicina, se estudió el comportamiento de 102 cepas de bacterias Gram negativas (82.3% enterobacterias, 17.7% no enterobacterias) frente a este antibiótico por dos métodos ampliamente usados en clínica, el sistema Wider y la difusión en agar, y por el nuevo método a validar. Los resultados se presentan en la **Tabla R19** y se resumen en la **Figura R11**. De las 102 cepas estudiadas, fueron calificadas como resistentes el 38.2% por el sistema Wider, el 38.2% por la técnica de difusión en agar y el 31.4% por los valores de corte de CM0; las cepas intermedias representaron el 3.9% por Wider, 5.9% por difusión en agar y 13.7% por el nuevo método; finalmente, un 57.8% fueron sensibles según Wider, un 55.9% según la difusión en agar y un 54.9% por el nuevo procedimiento. Se observa que las mayores discrepancias entre el método de los valores de corte de CM0 y las otras dos técnicas se

centraron en el grupo de cepas calificadas como intermedias, que fue notablemente mayor con este nuevo procedimiento.

Tabla R19. Calificación de aislados clínicos frente a gentamicina por sistema Wider, difusión en agar y CM0.

Cepa			Sistema Wider		Difusión de disco (10 µg)		Cortes de CM0	
Número	Referencia	Identificación	CMI (µg/ml)	Categoría	Diámetro de halo (mm)	Categoría	Halo (7.24/0.46 µg)	Categoría
1	25584	<i>E. coli</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
2	25598	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	18	S	Si/Si	S
3	25886	<i>S. plymuthica</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
4	25387	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
5	27056	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
6	27818	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	19	S	Si/Si	S
7	27846	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	27	S	Si/Si	S
8	27760	<i>E. coli</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
9	28924	<i>S. plymuthica</i>	≤ 2	S	21	S	Si/Si	S
10	28595	<i>E. coli</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
11	28886	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
12	28459	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
13	29574	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
14	29751	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	21	S	Si/Si	S
15	30391	<i>E. coli</i>	4	S	20	S	Si/Si	S
16	33254	<i>S. marcescens</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
17	33859	<i>E. coli</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
18	36579	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 2	S	19	S	Si/Si	S
19	36760	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
20	36770	<i>Salmonella</i> spp.	> 8	R	9	R	No/No	R
21	36241	<i>P. mirabilis</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
22	41070	<i>E. coli</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
23	41111	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	21	S	Si/Si	S
24	42435	<i>P. mirabilis</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
25	44474	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	24	S	Si/Si	S
26	45168	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	21	S	Si/Si	S
27	45355	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	22	S	Si/Si	S
28	45179	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	22	S	Si/Si	S
29	45356	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	23	S	Si/Si	S
30	45877	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	21	S	Si/Si	S
31	46611	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	23	S	Si/Si	S
32	46905	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	19	S	Si/Si	S
33	46821	<i>E. coli</i>	> 8	R	12	R	Si/No	I
34	47929	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 2	S	18	S	Si/Si	S
35	47870	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 2	S	17	S	Si/Si	S
36	48020	<i>K. oxytoca</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
37	49527	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
38	49551	<i>E. coli</i>	8	I	21	S	Si/Si	S
39	49968	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
40	49760	<i>E. coli</i>	> 8	R	0	R	No/No	R

Tabla R19. Continuación.

Cepa			Sistema Wider		Difusión de disco (10 µg)		Cortes de CM0	
Número	Referencia	Identificación	CMI (µg/ml)	Categoría	Diámetro de halo (mm)	Categoría	Halo (7.24/0.46 µg)	Categoría
41	49577	<i>S. marcescens</i>	4	S	21	S	Si/Si	S
42	50332	<i>E. coli</i>	4	S	18	S	Si/Si	S
43	51848	<i>E. coli</i>	4	S	20	S	Si/Si	S
44	51638	<i>P. mirabilis</i>	≤ 2	S	21	S	Si/Si	S
45	51862	<i>Salmonella</i> spp.	> 8	R	23	S	Si/Si	S
46	58131	<i>E. coli</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
47	58069	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	27	S	Si/Si	S
48	60161	<i>P. mirabilis</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
49	63681	<i>M. morgani</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
50	65925	<i>E. coli</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
51	6178	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	22	S	Si/Si	S
52	6176	<i>P. aeruginosa</i>	8	I	13	I	Si/No	I
53	6829	<i>E. coli</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
54	6949	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
55	6527	<i>Acinetobacter lwoffi</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
56	6952	<i>E. coli</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
57	6236	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	21	S	Si/Si	S
58	6739	<i>E. coli</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
59	6951	<i>E. coli</i>	> 8	R	9	R	Si/No	I
60	6984	<i>E. coli</i>	> 8	R	8	R	Si/No	I
61	7008	<i>E. coli</i>	> 8	R	8	R	No/No	R
62	7082	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
63	7276	<i>Acinetobacter baumannii</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
64	7384	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	18	S	Si/Si	S
65	7427	<i>A. baumannii</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
66	7588	<i>A. baumannii</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
67	7588	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
68	7610	<i>P. aeruginosa</i>	≤ 2	S	14	I	Si/No	I
69	8300	<i>P. aeruginosa</i>	4	S	13	I	Si/No	I
70	8071	<i>E. cloacae</i>	≤ 2	S	18	S	Si/Si	S
71	8344	<i>E. coli</i>	> 8	R	10	R	No/No	R
72	8743	<i>P. aeruginosa</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
73	8778	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
74	8978	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	19	S	Si/Si	S
75	9004	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	21	S	Si/Si	S
76	8802	<i>M. morgani</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
77	9031	<i>P. aeruginosa</i>	4	S	13	I	Si/No	I
78	9386	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	16	S	Si/Si	S
79	9397	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	16	S	Si/Si	S
80	9404	<i>P. aeruginosa</i>	4	S	15	S	Si/No	I

Tabla R19. Continuación.

Cepa			Sistema Wider		Difusión de disco (10 µg)		Cortes de CM0	
Número	Referencia	Identificación	CMI (µg/ml)	Categoría	Diámetro de halo (mm)	Categoría	Halo (7.24/0.46 µg)	Categoría
81	9487	<i>P. mirabilis</i>	> 8	R	11	R	Si/No	I
82	9534	<i>P. aeruginosa</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
83	9637	<i>P. aeruginosa</i>	4	S	13	I	Si/No	I
84	9646	<i>A. baumannii</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
85	9804	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
86	9259	<i>P. aeruginosa</i>	4	S	13	I	Si/No	I
87	9510	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	18	S	Si/Si	S
88	10205	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	19	S	Si/Si	S
89	10399	<i>P. mirabilis</i>	> 8	R	10	R	Si/No	I
90	9936	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
91	10244	<i>P. aeruginosa</i>	8	I	10	R	Si/No	I
92	10422	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
93	10429	<i>A. baumannii</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
94	10714	<i>E. coli</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
95	10840	<i>A. baumannii</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
96	10937	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
97	10244	<i>P. aeruginosa</i>	8	I	11	R	Si/No	I
98	11052	<i>E. coli</i>	> 8	R	20	S	Si/Si	S
99	11123	<i>E. coli</i>	> 8	R	0	R	No/No	R
100	11125	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 2	S	20	S	Si/Si	S
101	11128	<i>E. coli</i>	≤ 2	S	21	S	Si/Si	S
102	11265	<i>M. morgani</i>	≤ 2	S	22	S	Si/Si	S

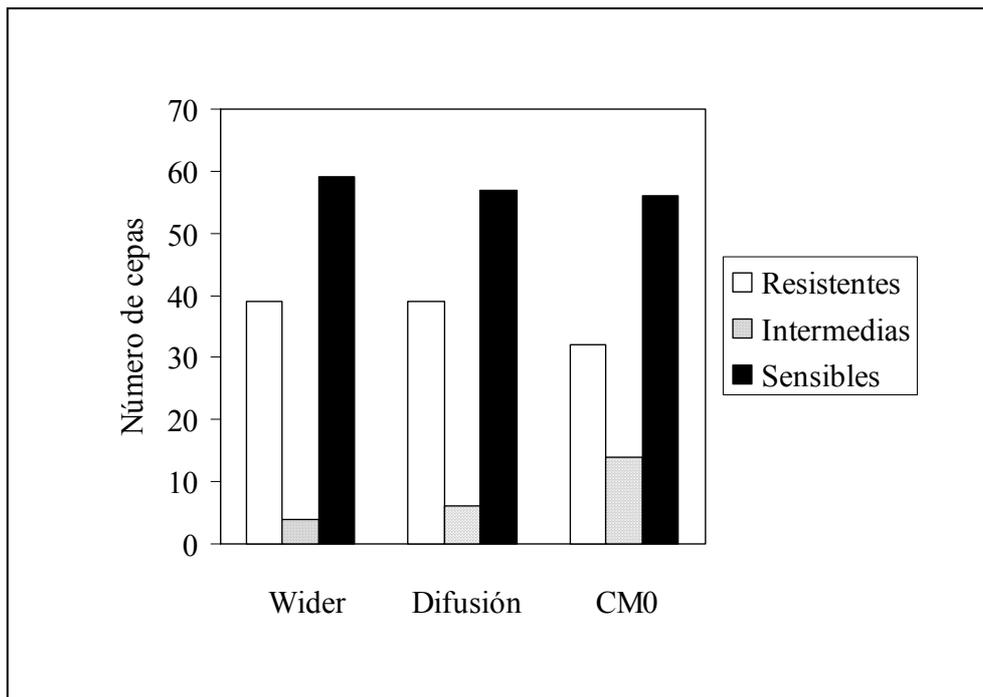


Figura R11. Determinación de 102 cepas de bacterias Gram negativas como resistentes, intermedias o sensibles a gentamicina, según el sistema Wider y los métodos de difusión en agar y valores de corte para CM0.

4.7.2. Comparación de los resultados obtenidos por el sistema Wider y el método de difusión en agar desde disco.

Para disponer de una referencia en el análisis estadístico de las comparaciones entre el nuevo método y los dos clásicos, el sistema Wider y el método de difusión en agar, se realizó en primer lugar una comparación entre los resultados obtenidos por los dos últimos. La correspondiente tabla de contingencia es la **Tabla R20**. El 94.9% de las 39 cepas calificadas como resistentes por el sistema Wider lo fueron también por el método de difusión en agar; 2 cepas resistentes por Wider fueron sensibles por la otra técnica. El sistema Wider encontró 4 cepas intermedias, pero solo una de ellas estaba entre las 6 intermedias por el método de difusión en agar; de las otras 3, 2 fueron resistentes y 1 sensible para el método de difusión en agar. De las 59 cepas sensibles según el sistema Wider, 54 coincidieron con el método de difusión en disco (que totalizó 57 en esta categoría), siendo las 5 restantes intermedias para este último método.

Tabla R20. Comparación de resultados con el sistema Wider y la técnica de difusión en agar.

Categorías por sistema Wider	Categorías por difusión en agar			Total
	Resistente	Intermedia	Sensible	
Resistente	37 (94.9%)	0 (0.0%)	2 (5.1%)	39 (100.0%)
Intermedia	2 (50.0%)	1 (25.0%)	1 (25.0%)	4 (100.0%)
Sensible	0 (0.0%)	5 (8.5%)	54 (91.5%)	59 (100.0%)
Total	39 (38.2%)	6 (5.9%)	57 (55.9%)	102 (100.0%)

El análisis estadístico chi-cuadrado de Pearson para la relación entre variables cualitativas dio un valor de 92.95 para χ^2 , con una significación $P < 0.001$, lo que confirma la significación de la relación entre las categorías establecidas por ambos métodos. El coeficiente de concordancia kappa para ambas técnicas fue 0.814 (el valor máximo es 1), con una significación < 0.001 .

4.7.3. Comparación de los resultados obtenidos por el sistema Wider y los valores de corte para CM0.

La **Tabla R21** compara los resultados obtenidos por el sistema Wider y por el nuevo método basado en los valores de corte para CM0. De las 39 cepas resistentes por el sistema Wider, solo 32 lo fueron también por el nuevo método; de las 7 restantes, 5 fueron calificadas de intermedias y 2 de sensibles. Es importante tener presente al respecto que estas dos cepas (nº 45 y nº 98) fueron también catalogadas como sensibles por la técnica de difusión en agar. El sistema Wider solo reportó 4 cepas intermedias, 3 de las cuales recibieron igual calificación por el nuevo método; la restante fue sensible. 59 cepas fueron sensibles para el sistema Wider, con 53 coincidencias con el nuevo método, que calificó de intermedias a las 6 restantes. El análisis estadístico dio un valor $\chi^2 = 94.56$, con una alta significación ($P < 0.001$). El coeficiente de correlación kappa fue 0.754 y la significación < 0.001 .

Tabla R21. Comparación de resultados con el sistema Wider y con valores de corte para CM0

Categorías por sistema Wider	Categorías por valores de corte para CM0			Total
	Resistente	Intermedia	Sensible	
Resistente	32 (82.1%)	5 (12.8%)	2 (5.1%)	39 (100.0%)
Intermedia	0 (0.0%)	3 (75.0%)	1 (25.0%)	4 (100.0%)
Sensible	0 (0.0%)	6 (10.2%)	53 (89.8%)	59 (100.0%)
Total	32 (31.4%)	14 (13.7%)	56 (54.9%)	102 (100.0%)

4.7.4. Comparación de los resultados obtenidos por el método de difusión en agar desde disco y los valores de corte para CM0.

La **Tabla R22** compara los resultados obtenidos por el método de difusión en agar y por el nuevo método basado en los valores de corte para CM0. En este caso, la correlación fue mejor que en el anterior. De las 39 cepas resistentes según el método de difusión en agar, 32 fueron también resistentes para el nuevo método; las 7 restantes las calificó como intermedias. Las 6 cepas intermedias según el método de difusión en agar recibieron igual calificación por el nuevo método. Finalmente, de las 57 cepas sensibles según el método de difusión en agar, 56 fueron también sensibles para el nuevo método, que solo cambió la calificación de una de ellas por la de intermedia. En consecuencia, se obtuvo un valor de $\chi^2 = 134.9$, con $P < 0.001$. El coeficiente de correlación kappa alcanzó 0.86 (significación < 0.001).

Tabla R22. Comparación de resultados con difusión en agar y con valores de corte para CM0

Categorías por difusión en agar	Categorías por valores de corte para CM0			Total
	Resistente	Intermedia	Sensible	
Resistente	32 (82.1%)	7 (17.9%)	0 (0.0%)	39 (100.0%)
Intermedia	0 (0.0%)	6 (100.0%)	0 (0.0%)	6 (100.0%)
Sensible	0 (0.0%)	1 (1.8%)	56 (98.2%)	57 (100.0%)
Total	32 (31.4%)	14 (13.7%)	56 (54.9%)	102 (100.0%)

La **Figura R12** presenta una imagen de dos placas de Agar Mueller-Hinton con cepas de *P. aeruginosa* y *E. coli*, que fueron sensibles por ambos métodos. Nótese que la presencia de un halo de inhibición definido en torno al disco de menor concentración, por pequeño que sea, califica a la cepa de sensible. En la **Figura R13** se ve una placa de *P. aeruginosa*, calificada como intermedia por el método basado en los valores de corte para CM0 (presencia de halo en torno al disco de mayor concentración y ausencia en torno al de menor concentración) y resistente por el método de difusión en agar. Es interesante señalar que de las 11 cepas de *P. aeruginosa* incluidas en esta validación, 9 fueron consideradas intermedias por el método de los valores de corte para CM0 de gentamicina (6 lo fueron por el método de difusión en agar y 3 por el sistema Wider).

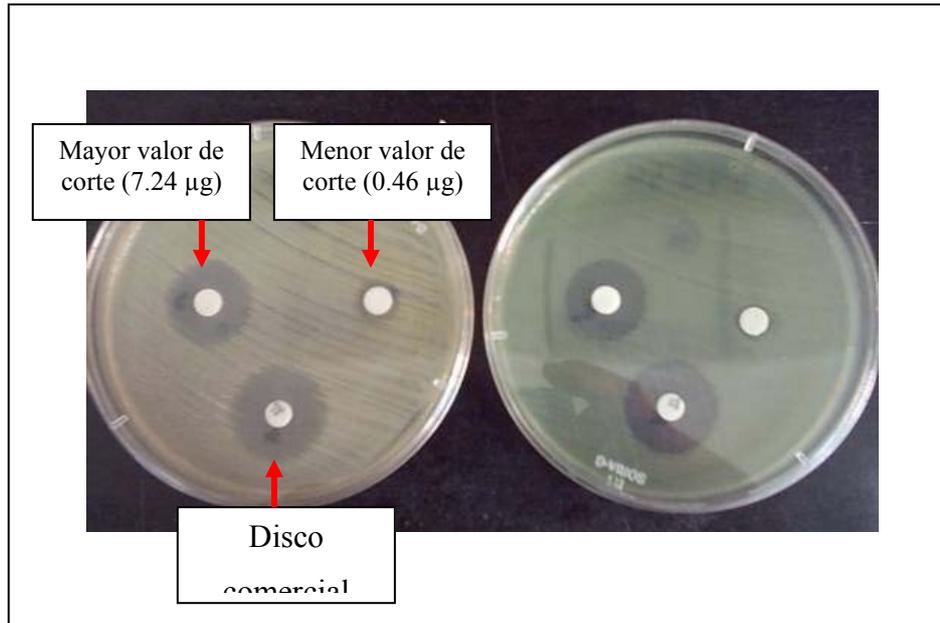


Figura R12. Placas de Agar Mueller-Hinton con cepas de *P. aeruginosa* (derecha) y *E. coli* (izquierda). Las dos cepas son sensibles a gentamicina por el método de difusión en agar y el método de valores de corte de CM0.



Figura R13. *P. aeruginosa* en Muller-Hinton testada frente gentamicina por difusión en agar (11mm = resistente) y por valores de corte (halo en el disco de mayor carga = intermedia).

4.8. VALIDACIÓN DE LOS VALORES DE CORTE PARA CM0 DE CIPROFLOXACINO.

4.8.1. Calificación de aislados clínicos según el sistema Wider, el método de difusión en agar desde disco y los valores de corte para CM0.

La validación de la técnica basada en el establecimiento de valores de corte para CM0 de ciprofloxacino se realizó ensayando 102 cepas de bacterias Gram negativas (83.3% enterobacterias, 16.7% no enterobacterias) frente a este antibiótico por el sistema Wider, el método de difusión en agar desde disco y el nuevo método a validar. Los resultados se presentan en la **Tabla R23** y se resumen en la **Figura R14**. De las 102 cepas estudiadas, las cepas resistentes representaron el 49.0% por el sistema Wider, el 48.0% por la técnica de difusión en agar y el 48.0% por los valores de corte de CM0; las cepas intermedias constituyeron el 2.9% por Wider, 5.9% por difusión en agar y 8.8% por el nuevo método; finalmente, las cepas sensibles fueron el 48.0% según el sistema Wider, el 46.1% por difusión en agar y un 43.1% por el nuevo procedimiento.

Tabla R23. Calificación de aislados clínicos frente a ciprofloxacino por sistema Wider, difusión en agar y CM0.

Cepa			Sistema Wider		Difusión de disco (5 µg)		Cortes de CM0	
Número	Referencia	Identificación	CMI (µg/ml)	Categoría	Diámetro de halo (mm)	Categoría	Halo (1.45/0.08 µg)	Categoría
1	25584	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
2	25921	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
3	25886	<i>S. plymuthica</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
4	26331	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
5	26367	<i>E. cloacae</i>	≤ 0.12	S	30	S	Si/Si	S
6	26788	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
7	27846	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
8	27760	<i>E. coli</i>	4	R	16	I	Si/No	I
9	28844	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	31	S	Si/Si	S
10	28759	<i>E. cloacae</i>	≤ 0.12	S	26	S	Si/Si	S
11	28036	<i>S. marcescens</i>	1	S	30	S	Si/Si	S
12	28459	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 0.12	S	28	S	Si/Si	S
13	30887	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
14	30534	<i>K. oxytoca</i>	≤ 0.12	S	28	S	Si/Si	S
15	30387	<i>M. morgani</i>	≤ 0.12	S	26	S	Si/Si	S
16	30391	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	27	S	Si/Si	S
17	33211	<i>S. marcescens</i>	≤ 0.12	S	32	S	Si/Si	S
18	33333	<i>E. aerogenes</i>	≤ 0.12	S	33	S	Si/Si	S
19	36579	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 0.12	S	30	S	Si/Si	S
20	36760	<i>K. pneumoniae</i>	> 4	R	7	R	No/No	R
21	36770	<i>Salmonella</i> spp.	≤ 0.12	S	32	S	Si/Si	S
22	49760	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	35	S	Si/Si	S
23	50332	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	25	S	Si/Si	S
24	50303	<i>P. mirabilis</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
25	51848	<i>E. coli</i>	1	S	22	S	Si/Si	S
26	51293	<i>M. morgani</i>	4	R	10	R	No/No	R
27	52646	<i>P. mirabilis</i>	> 4	R	8	R	No/No	R
28	52326	<i>P. mirabilis</i>	≤ 0.12	S	30	S	Si/Si	S
29	52481	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 0.12	S	24	S	Si/Si	S
30	52781	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
31	53661	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	24	S	Si/Si	S
32	53272	<i>E. coli</i>	> 4	R	11	R	No/No	R
33	58131	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
34	58069	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
35	60161	<i>P. mirabilis</i>	1	S	21	S	Si/No	I
36	60156	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	24	S	Si/Si	S
37	63681	<i>M. morgani</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
38	64238	<i>M. morgani</i>	1	S	20	I	Si/No	I
39	64473	<i>E. coli</i>	> 4	R	9	R	No/No	R
40	64736	<i>E. coli</i>	> 4	R	9	R	No/No	R

Tabla R23. Continuación.

Cepa			Sistema Wider		Difusión de disco (5 µg)		Cortes de CM0	
Número	Referencia	Identificación	CMI (µg/ml)	Categoría	Diámetro de halo (mm)	Categoría	Halo (1.45/0.08 µg)	Categoría
41	65925	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
42	65964	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	30	S	Si/Si	S
43	66285	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
44	67231	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
45	67145	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
46	6178	<i>E. coli</i>	> 4	R	9	R	No/No	R
47	6176	<i>P. aeruginosa</i>	1	S	27	S	Si/No	I
48	6829	<i>E. coli</i>	> 4	R	7	R	No/No	R
49	6949	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	33	S	Si/Si	S
50	6527	<i>A. lwoffii</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
51	6952	<i>E. coli</i>	> 4	R	8	R	No/No	R
52	6236	<i>E. coli</i>	> 4	R	12	R	No/No	R
53	6739	<i>E. coli</i>	> 4	R	10	R	No/No	R
54	6951	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
55	6984	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
56	7008	<i>E. coli</i>	1	S	21	S	Si/Si	S
57	7082	<i>K. pneumoniae</i>	2	I	20	I	Si/No	I
58	7276	<i>A. baumannii</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
59	7384	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	26	S	Si/Si	S
60	7427	<i>A. baumannii</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
61	7588	<i>A. baumannii</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
62	07588-2	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 0.12	S	23	S	Si/Si	S
63	7610	<i>P. aeruginosa</i>	≤ 0.12	S	28	S	Si/Si	S
64	8300	<i>P. aeruginosa</i>	> 4	R	7	R	No/No	R
65	8071	<i>E. cloacae</i>	≤ 0.12	S	32	S	Si/Si	S
66	7970	<i>E. cloacae</i>	≤ 0.12	S	32	S	Si/Si	S
67	7985	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
68	8162	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	25	S	Si/Si	S
69	8344	<i>E. coli</i>	> 4	R	9	R	No/No	R
70	8710	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	27	S	Si/Si	S
71	8682	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	34	S	Si/Si	S
72	8182	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 0.12	S	27	S	Si/Si	S
73	8743	<i>P. aeruginosa</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
74	8978	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
75	9004	<i>E. coli</i>	> 4	R	7	R	No/No	R
76	8802	<i>M. morgani</i>	1	S	18	I	Si/No	I
77	9031	<i>P. aeruginosa</i>	≤ 0.12	S	27	S	Si/Si	S
78	9386	<i>E. coli</i>	> 4	R	13	R	No/No	R
79	9397	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
80	9404	<i>P. aeruginosa</i>	≤ 0.12	S	27	S	Si/Si	S

Tabla R23. Continuación.

Cepa			Sistema Wider		Difusión de disco (5 µg)		Cortes de CM0	
Número	Referencia	Identificación	CMI (µg/ml)	Categoría	Diámetro de halo (mm)	Categoría	Halo (1.45/0.08 µg)	Categoría
81	9487	<i>P. mirabilis</i>	≤ 0.12	S	33	S	Si/Si	S
82	9534	<i>P. aeruginosa</i>	2	I	19	I	Si/No	I
83	9637	<i>P. aeruginosa</i>	1	S	25	S	Si/No	I
84	9646	<i>A. baumannii</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
85	9804	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	25	S	Si/Si	S
86	9259	<i>P. aeruginosa</i>	≤ 0.12	S	28	S	Si/Si	S
87	9510	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	25	S	Si/Si	S
88	10205	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
89	10399	<i>P. mirabilis</i>	≤ 0.12	S	34	S	Si/Si	S
90	9936	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
91	10244	<i>P. aeruginosa</i>	1	S	25	S	Si/Si	S
92	10422	<i>K. pneumoniae</i>	≤ 0.12	S	28	S	Si/Si	S
93	10429	<i>A. baumannii</i>	4	R	13	R	No/No	R
94	10714	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
95	10840	<i>A. baumannii</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
96	10937	<i>E. coli</i>	≤ 0.12	S	33	S	Si/Si	S
97	10244	<i>P. aeruginosa</i>	1	S	33	S	Si/Si	S
98	11052	<i>E. coli</i>	2	I	19	I	Si/Si	S
99	11123	<i>E. coli</i>	> 4	R	0	R	No/No	R
100	11125	<i>K. pneumoniae</i>	4	R	11	R	No/No	R
101	11128	<i>E. coli</i>	1	S	24	S	Si/Si	S
102	11265	<i>M. morgani</i>	≤ 0.12	S	33	S	Si/Si	S

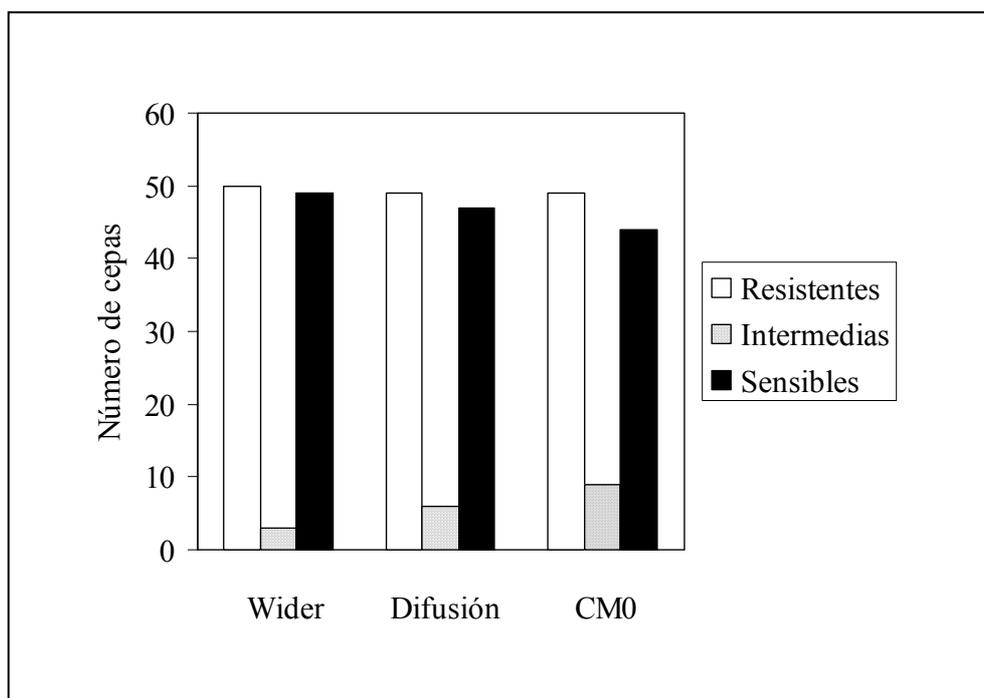


Figura R14. Determinación de 102 cepas de bacterias Gram negativas como resistentes, intermedias o sensibles a ciprofloxacino, según el sistema Wider y los métodos de difusión en agar y valores de corte para CM0.

4.8.2. Comparación de los resultados obtenidos por el sistema Wider y el método de difusión en agar desde disco.

La comparación de resultados obtenidos con el sistema Wider y con el método de difusión en agar, se presenta en la **Tabla R24**. El sistema Wider detectó 50 cepas resistentes, 49 de las cuales lo fueron también por el método de difusión en disco; la otra cepa fue calificada de intermedia por este método. Según el sistema Wider, 3 cepas se comportaron como intermedias, número que se elevó a 6 con el método de difusión en disco, que añadió a esta categoría una cepa resistente y 2 sensibles según el Wider. En cuanto a las cepas sensibles, el sistema Wider estableció su número en 49, que el método de difusión en disco rebajó a 47, ya que 2 cepas sensibles según Wider fueron intermedias para el método de difusión en agar.

El análisis estadístico chi-cuadrado de Pearson dio un valor de 148.52 para χ^2 , con una significación $P < 0.001$, lo que confirma la significación de la relación entre las categorías establecidas por ambos métodos. El coeficiente de concordancia kappa para ambas técnicas fue 0.946, con una significación < 0.001 .

Tabla R24. Comparación de resultados con el sistema Wider y la técnica de difusión en agar.

Categorías por sistema Wider	Categorías por difusión en agar			Total
	Resistente	Intermedia	Sensible	
Resistente	49 (98.0%)	1 (2.0%)	0 (0.0%)	50 (100.0%)
Intermedia	0 (0.0%)	3 (100.0%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)
Sensible	0 (0.0%)	2 (4.1%)	47 (95.9%)	49 (100.0%)
Total	49 (48.0%)	6 (5.9%)	47 (46.1%)	102 (100.0%)

4.8.3. Comparación de los resultados obtenidos por el sistema Wider y los valores de corte para CM0.

La tabla de contingencia correspondiente a la comparación de resultados entre el sistema Wider y el nuevo procedimiento se presenta como **Tabla R25**. Las cepas resistentes fueron 50 según el sistema Wider y 49 según el nuevo método; la cepa restante se clasificó como intermedia. Wider detectó 3 cepas intermedias, de las que solo 2 fueron catalogadas como tales por el nuevo método; la restante se determinó como sensible. Las cepas calificadas como sensibles por el sistema Wider fueron 49, de las que el nuevo método reconoció solo 43; las otras 6 fueron intermedias.

Tabla R25. Comparación de resultados con el sistema Wider y con valores de corte para CM0

Categorías por sistema Wider	Categorías por valores de corte para CM0			Total
	Resistente	Intermedia	Sensible	
Resistente	49 (98.0%)	1 (2.0%)	0 (0.0%)	50 (100.0%)
Intermedia	0 (0.0%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	3 (100.0%)
Sensible	0 (0.0%)	6 (12.2%)	43 (87.8%)	59 (100.0%)
Total	49 (48.0%)	9 (8.8%)	44 (43.1%)	102 (100.0%)

El análisis estadístico chi-cuadrado de Pearson dio un valor de 109.87 para χ^2 , con una significación $P < 0.001$, lo que confirma la significación de la relación entre las categorías establecidas por ambos métodos. El coeficiente de concordancia kappa para ambas técnicas fue 0.859, con una significación < 0.001 .

4.8.4. Comparación de los resultados obtenidos por el método de difusión en agar desde disco y los valores de corte para CM0.

La **Tabla R26** es la tabla de contingencia correspondiente a la comparación del método de difusión en agar y el basado en los puntos de corte para valores de CM0. Ambos procedimientos encontraron las mismas cepas resistentes: 49. Hubo 6 cepas intermedias según el método de difusión en agar, de las cuales el nuevo método detectó 5; la restante fue calificada como sensible. De las 47 cepas sensibles según el método de difusión en agar, 43 fueron igualmente sensibles para el nuevo procedimiento; las otras 4 se determinaron como intermedias.

El análisis estadístico chi-cuadrado de Pearson dio un valor de 142.67 para χ^2 , con una significación $P < 0.001$, por lo que la relación entre las categorías establecidas

por ambos métodos es significativa. El coeficiente de concordancia kappa para ambas técnicas fue 0.913, con una significación < 0.001 .

Tabla R26. Comparación de resultados con difusión en agar y con valores de corte para CM0

Categorías por difusión en agar	Categorías por valores de corte para CM0			Total
	Resistente	Intermedia	Sensible	
Resistente	49 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	49 (100.0%)
Intermedia	0 (0.0%)	5 (83.3%)	1 (16.7%)	6 (100.0%)
Sensible	0 (0.0%)	4 (8.5%)	43 (91.5%)	47 (100.0%)
Total	49 (48.0%)	9 (8.8%)	44 (43.1%)	102 (100.0%)

La **Figura R15** muestra las fotografías de dos placas, una de ellas sembrada con una cepa de *Proteus mirabilis*, sensible a ciprofloxacino por los métodos de difusión en agar y valores de corte para CM0, y la otra sembrada con una cepa de *A. baumannii*, resistente por ambos métodos. La **Figura R16** corresponde a una cepa de *E. coli*, también sensible por ambos métodos.

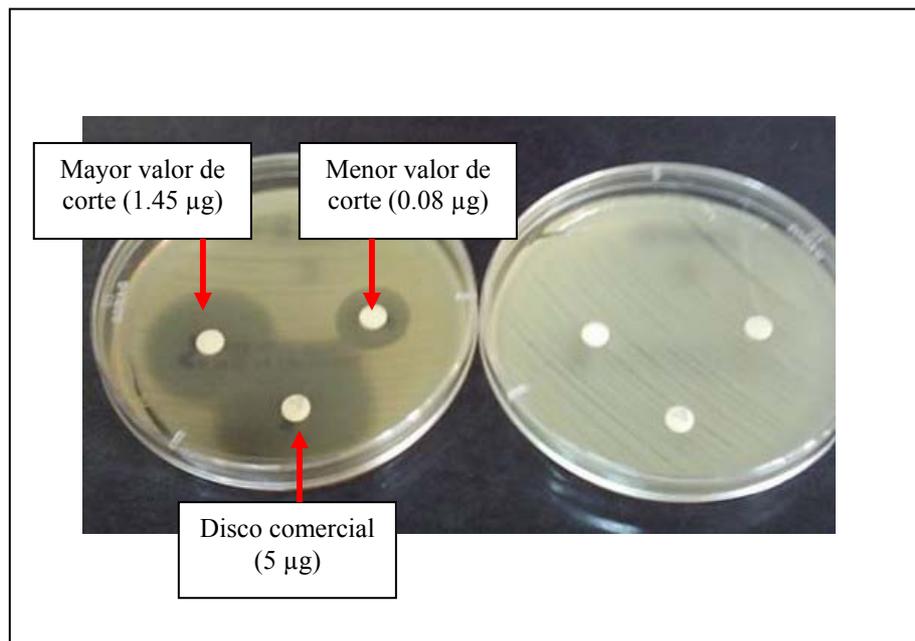


Figura R15. *P. mirabilis* (izquierda, sensible) y *A. baumannii* (derecha, resistente) testadas con ciprofloxacino por el método de valores de corte para CM0 y por el método de difusión en agar desde un disco comercial (5 µg).



Figura R16. *E. coli* sensible a ciprofloxacino por los dos métodos.

5. DISCUSSION

Los resultados presentados en esta Memoria establecen la existencia de una relación entre los valores de CMI y los de CM₀, que se puede expresar como una fórmula matemática en la que intervienen distintas constantes para cada antibiótico. Con ello, suministran una extensa base experimental para la aplicación del concepto de “carga crítica”, entendida como la máxima carga de antibiótico que no origina halo de inhibición de crecimiento, al desarrollo de un método sencillo para la determinación de cepas bacterianas como sensibles, intermedias o resistentes. Dicho método ha sido desarrollado para los antibióticos gentamicina y ciprofloxacino, estableciendo los correspondientes valores de corte frente a enterobacterias. Finalmente, el método ha sido validado para ambos antibióticos y bacterias Gram negativas, comparando su poder de predicción con dos procedimientos ampliamente usados en microbiología clínica, como son el sistema Wider y la técnica de difusión en agar a partir de discos. Un riguroso análisis estadístico de los resultados obtenidos ha confirmado en todos los casos la significación de las correlaciones encontradas, tanto en el desarrollo como en la validación del nuevo método. A continuación, se realizan algunas consideraciones sobre los resultados obtenidos.

5.1. RELACION ENTRE CMI Y CM0.

5.1.1. Distintos procedimientos para establecer CMI.

En la primera parte del trabajo experimental de esta Tesis, se establecieron los valores de CMI de aislados clínicos de enterobacterias por distintos procedimientos, ampliamente utilizados en microbiología clínica: técnica de dilución agar, E-test y sistema Wider. El primero de ellos es considerado la técnica de referencia (“gold standard”) en los países europeos [European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2000]. La comparación de los resultados obtenidos con estos procedimientos tiene gran interés en nuestro trabajo, ya que, además de revelar su homogeneidad (y, por tanto, la calidad de realización de las técnicas), define un marco de referencia para la posterior comparación con los valores de carga crítica.

Dado que el sistema Wider no proporciona una medida cuantitativa exacta de la CMI, sino que ofrece resultados semicuantitativos, la comparación con los métodos de dilución en agar y E-test no puede hacerse con el análisis estadístico aplicable a la comparación entre estos dos últimos. Sin embargo, las combinaciones enterobacterias – gentamicina y enterobacterias – ciprofloxacino figuran entre las consideradas adecuadas para la aplicación de métodos semicuantitativos que clasifiquen las cepas en sensibles, intermedias y resistentes [Cornaglia *et al.*, 2004]. Siguiendo esta clasificación, el sistema Wider solo discrepó de alguno de los dos métodos de determinación de CMI en un 5.0% de las cepas ensayadas frente a gentamicina, y en un 2.2% de las ensayas frente a ciprofloxacino. Estos valores son aceptables si se les compara con los obtenidos por otros autores en una extensa comparación entre el sistema Wider y la determinación de CMI por el método de microdilución en caldo: cuando se examinaron 138 enterobacterias frente a gentamicina, la coincidencia fue del 97.1%, y frente a ciprofloxacino, fue del 92.0% [Canton *et al.*, 2000]. Según los criterios de interpretación del NCCLS [National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999], las discrepancias al comparar un método problema con uno de referencia se califican como “errores muy graves” (*very major errors*) cuando el primer método define a una cepa como sensible y el de referencia como resistente; “errores graves” (*major errors*) si el método problema define resistente y el de referencia sensible; y “errores menores” (*minor errors*) si el método problema define intermedia y el de

referencia sensible o resistente, o si el método problema define sensible o resistente y el de referencia intermedia. Aplicando estos criterios, todas las discrepancias observadas en nuestro trabajo con gentamicina y con ciprofloxacino deben calificarse como errores menores.

La comparación de los métodos de dilución en agar y E-test corroboró la excelente correlación entre ambos. En el caso de la gentamicina, solo una cepa (la nº 40) de las 80 testadas fue calificada como resistente por E-test e intermedia por dilución en agar, lo que, considerando este como método de referencia, significa un “error menor”. Del mismo modo, solo una (nº 78) de las 91 cepas testadas con ciprofloxacino ofreció una discrepancia real, ya que fue resistente por E-test e intermedia por dilución en agar (“error menor”). Otras diferencias en los valores numéricos de CMI se deben, como ya se ha indicado, a la mayor precisión del E-test, que ofrece concentraciones intermedias entre las diluciones dobladas del método de dilución en agar. Con ambos antibióticos, el análisis estadístico de los datos obtenidos por los dos métodos confirmó la excelencia de la correlación, que asimismo viene respaldada por la bibliografía consultada al respecto [Best *et al.*, 2003].

5.1.2. Los valores de CM0 son constantes.

La teoría predice que el valor de CM0 no debe verse significativamente influido por factores relacionados con el proceso de difusión, ya que, por definición, un disco cuya carga coincida con el valor de CM0 no origina un halo de inhibición del crecimiento. Las diferentes fórmulas propuestas para expresar las bases de la difusión en agar a partir de discos coinciden en esta predicción, para los casos en que el diámetro o el radio del halo sea igual a cero [Kronwall, 1982, 2000].

Nuestros resultados, tanto en el caso de gentamicina como en el de ciprofloxacino, confirmaron la constancia de los valores de CM0 en condiciones de variación de medio de cultivo y de temperatura de incubación, como evidenciaron los altos valores del coeficiente de correlación de Pearson; los valores más bajos, correspondientes al cambio simultáneo de medio y temperatura, fueron de 0.986 para gentamicina y 0.995 para ciprofloxacino.

Esta independencia de la CM0 respecto de factores que tienen influencia significativa sobre las técnicas clásicas de difusión en agar [Kronwall, 1982] y CMI [Drugeon *et al.*, 1987] es una propiedad relevante que añadir a las ventajas de la técnica propuesta en el presente trabajo.

5.1.3. Relación entre CMI y CM0 y determinación de “valores de corte” para CM0.

Las diversas ecuaciones que se han propuesto para expresar la teoría de las zonas de inhibición establecen una relación sencilla entre CM0 y CMI. Kronwall [1982], parte de la siguiente ecuación:

$$Z^2 = A \times \log Q - A \times \log \text{CMI} + B$$

Siendo Z el diámetro del halo de inhibición y Q la concentración de antibiótico en el disco. Si $Z = 0$, la carga del disco será la carga crítica, que nosotros designamos CM0:

$$A \times \log \text{CM0} = A \times \log \text{CMI} + B$$

Esta fórmula nos permite el cálculo de CMI (no incluido en el trabajo citado):

$$\text{CMI} = K \times \text{CM0}$$

(En esta última expresión, K es una constante tal que $\log K = \log 1 - B/A$)

En un trabajo posterior, Kronwall [2000] propone ya explícitamente esta relación, en la que nuestra constante K aparece como “factor de conversión”, CF:

$$Q_{\text{zero}} \times \text{CF} = \text{CMI}$$

En la notación de Kronwall, Q_{zero} es la carga crítica que nosotros designamos CM0.

De acuerdo con nuestros resultados, la relación entre CM0 y CMI adopta una forma algo más compleja. Las ecuaciones halladas fueron las siguientes:

$$\text{CMI} = 4.33 \times \text{CM0}^{1.022} \text{ (gentamicina)}$$

$$\text{CMI} = 5.66 \times \text{CM0}^{0.944} \text{ (ciprofloxacino)}$$

Por tanto, la fórmula general sería:

$$\text{CMI} = A' \times \text{CM0}^{B'}$$

(Donde A' y B' son coeficientes distintos de A y B de la ecuación de Kronwall)

Esta ecuación indica que la relación es lineal cuando se comparan valores logarítmicos de CMI y CM0, pero no con valores absolutos. Sin embargo, en ambos casos, los valores del exponente fueron muy próximos a la unidad, lo que puede hacer aceptable la aproximación de Kronwall. Es de resaltar que los coeficientes de correlación entre CMI y CM0 hallados para ambos antibióticos (0.980 en ambos casos) fueron perfectamente comparables a los encontrados por **Kronwall [2000]** al comparar valores de CMI reales y calculados mediante su ecuación, con ácido fúsidico (0.9822) y ciprofloxacino (0.9696).

Los valores de corte para CM0 se obtuvieron a partir de las intersecciones de los valores de corte para CMI con las bandas de aceptación para la relación CMI/CM0. Este procedimiento debe minimizar los errores graves que se cometan en la predicción de sensibilidad y resistencia.

5.2. PODER PREDICTIVO DE LOS VALORES DE CORTE PARA CM0: VALIDACIÓN DEL NUEVO METODO.

El análisis estadístico de los resultados de validación, con un número suficiente de cepas (102 para ambos antibióticos) evidenció el alto nivel de significación de la relación entre las categorías (sensible, intermedia y resistente) establecidas por el

método a validar y por cualquiera de los dos métodos perfectamente acreditados en clínica, como son el sistema Wider y el de difusión en agar.

En el caso de la gentamicina, la comparación entre el nuevo método, basado en valores de corte para carga crítica, y el sistema Wider, detectó dos errores muy graves, ninguno grave y 12 menores; la comparación entre el nuevo método y el de difusión en agar no encontró ningún error muy grave ni grave, y 8 errores menores. Hay que reseñar que las dos cepas clasificadas como sensibles por el nuevo método y como resistentes por el Wider (los dos errores muy graves), fueron calificadas de sensibles por el método de difusión en agar.

En cuanto al ciprofloxacino, entre el nuevo método y el sistema Wider ocurrieron solo 8 errores menores (ninguno muy grave ni grave), que se redujeron a 5 al comparar el nuevo método con el de difusión en agar.

5.3. VENTAJAS Y LIMITACIONES DEL NUEVO METODO.

Los excelentes resultados de los procesos de validación con ambos antibióticos y frente a dos procedimientos de amplio uso en microbiología clínica, como son el sistema Wider y la técnica de difusión en agar, avalan al método de valores de corte para CM0, que, en comparación con los métodos actualmente en uso, posee indudables aspectos ventajosos. Es un método de ejecución muy sencilla, que no requiere instrumental especial, ni un entrenamiento específico del personal: los requerimientos técnicos son los mismos que para el método de difusión en agar, justamente valorado por su sencillez [Turnidge *et al.*, 2003]. A igual que con este, el nuevo método permite ensaya, con bajo coste, un gran número de cepas y de agentes antimicrobianos [Nijs *et al.*, 2003]. La lectura es, obviamente, más rápida y fácil que en este método, ya que no hay que medir diámetros de halos de inhibición: basta con apreciar directamente la existencia o no de halo. Ni la temperatura de incubación ni el medio de cultivo ejercen influencia significativa en los resultados obtenidos con el método de valores de corte para CM0, lo que constituye una importante ventaja adicional. En comparación con procedimientos como el E-test o los sistemas tipo Wider, el nuevo método tiene costes muy reducidos, similares a los del método de difusión en agar.

A falta de nuevos estudios que extiendan el método de valores de corte para CM0 a otros grupos bacterianos y otros agentes antimicrobianos, su mayor limitación es la de dar como resultados la clasificación de las cepas bacterianas en categorías, sin producir valores cuantitativos de CMI. Sin embargo, diversos estudios coinciden en que no hay evidencias de que la determinación de CMI presente ventajas reales respecto del establecimiento de categorías, en lo que se refiere al éxito del tratamiento [**Craig, W.A. 1993; Jorgensen, 1993**].

6. CONCLUSIONES

1. La comparación de los valores de CMI obtenidos por los métodos de dilución en agar, considerado método de referencia, y E-test, para los antibióticos gentamicina y ciprofloxacino con aislados clínicos de enterobacterias, confirma la excelente correlación entre ambos métodos, así como la validez del segundo como alternativa válida para el primero.
2. Se define el concepto de carga crítica como la máxima concentración de un antibiótico que, incorporada a un disco de dimensiones estándar, no produce ningún halo de inhibición. El concepto y los valores correspondientes son distintos de los conceptos de CMI y concentración crítica.
3. Las determinaciones realizadas con gentamicina y ciprofloxacino demuestran que los valores de carga crítica son independientes de la temperatura de incubación y del medio de cultivo.
4. Hay una relación lineal entre los valores de carga crítica y los de CMI, expresados como logaritmos. Nuestras determinaciones para gentamicina y ciprofloxacino ofrecieron valores de carga crítica en un intervalo de tres a cinco veces menores que la CMI.

5. Se han establecido los valores de corte para carga crítica de gentamicina y ciprofloxacino, que permiten clasificar aislados clínicos de enterobacterias en las categorías de sensibles, intermedios y resistentes.

6. La evaluación de la capacidad predictiva del método propuesto basado en los valores de corte para carga crítica de gentamicina y ciprofloxacino, en comparación con los métodos de difusión en agar y del sistema Wider, con más de un centenar de aislados clínicos de bacterias Gram-negativas, mostró correlaciones excelentes, avalando la utilidad del nuevo método.

7. El nuevo método propuesto posee evidentes ventajas sobre los actualmente utilizados en el laboratorio clínico, como son la sencillez de ejecución, sin requerimientos de instrumental especial ni de personal específicamente entrenado; el coste reducido; la facilidad y rapidez de lectura; y la posibilidad de ensayar simultáneamente gran número de cepas y de agentes antimicrobianos.

7. BIBLIOGRAFIA

Beck, R.W. 2000. A chronology of microbiology. ASM Press, Washington.

Best, L.M., Haldane, D.J.M., Keelan, M., Taylor, D.E., Thomson, A.B.R., Loo, V., Fallone, C.A., Lyn, P., Smaill, F.M., Hunt, R., Gaudreau, C., Kennedy, J., Alfa, M., Pelletier, R. y Veldhuyzen van Zanten, S.J.O. 2003. Multilaboratory comparison of proficiencies in susceptibility testing of *Helicobacter pylori* and correlation between agar dilution and E test methods. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:3138-3144.

Bradford, P. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin. Microbiol. Rev. **14**:933-951.

Canton, R., Perez-Vazquez, M., Oliver, A., Sánchez del Saz, B., Gutierrez, M.O., Martinez-Ferrer, M. y Baquero, F. 2000. Evaluation of the Wider system, a new computer-assisted image-processing device for bacterial identification and susceptibility testing. J. Clin. Microbiol. **38**:1339-1346.

Chambers, H.F. 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin. Microbiol. Rev. **10**:781-791.

Cornaglia, G., Hryniewicz, W., Jarlier, V., Kahlmeter, G., Mittermayer, H., Stratchounski, L. y Baquero, F. 2004. European recommendations for antimicrobial resistance surveillance. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:349-383.

Craig, W.A. 1993. Qualitative susceptibility tests versus quantitative MIC tests. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **16**:231-236.

Druegon, H.B., Juvin, M.B., Caillon, J., Courtieu, A.L. 1987. Assessment of formulas for calculating critical concentration by the agar diffusion method. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:870-875.

Eliopoulos, G.M. 2002. Resistance problems associated with the *Enterococcus*, p. 295-329. En K. Lewis, A.A. Salyers, H.W. Taber y R.G. Wax (eds.), *Bacterial resistance to antimicrobials*. Marcel Dekker Inc., New York.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2000. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of antibacterial agents by agar dilution. EUCAST discussion document. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**:509-515.

Falk, P., Hooper, L., Midtvedt, T. y Gordon, J. 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1157-1170.

Fiel, E.J. y Spratt, B.G. 2001. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:561-590.

Hooper, D.C. 2002. Target modification as a mechanism of antimicrobial resistance, p. 161-192. En K. Lewis, A.A. Salyers, H.W. Taber y R.G. Wax (eds.), *Bacterial resistance to antimicrobials*. Marcel Dekker Inc., New York.

Hughes, A.L. 2002. Evolution of the host defense system, p. 67-75. En S.H.E. Kaufmann, A. Sher y R. Ahmed (eds.), *Immunology of infectious diseases*. ASM Press, Washington.

Ingraham, J.L. e Ingraham, C.A. 1998. Introducción a la microbiología (tomos 1 y 2). Editorial Reverté S.A., Barcelona.

Isenberg, H. D. 1992. Antimicrobial susceptibility testing, p. 5.1-5.19 . En J. Hindler (ed.), Microbiology Procedures Handbook. ASM, Washington.

Jiménez-Valera, M., Ruiz-Bravo, A., Ramos-Cormenzana, A. 2003. Bacterial resistance to antimicrobial agents: mechanisms and challenges, p. 63-81. En G. Alvarez de Cienfuegos, A. Ruiz-Bravo y M.A. de Pablo (eds.), New approaches in the use of antibiotics. Research Singpost, Trivandrum.

Jorgensen, J.H. 1993. Selection criteria for an antimicrobial susceptibility testing system. J. Clin. Microbiol. **31**:2841-2844.

Kotewicz, M.L., Brown, E.W., LeClerc, J.E. y Cebula, T.A. 2003. Genomic variability among enteric pathogens: the case of the mutS-rpoS intergenic region. Trends Microbiol. **11**:2-6.

Kronwall, G. 1982. Analysis of a single reference strain for determination of gentamicin regression line constants and inhibition zone diameter breakpoints in quality control of disk diffusion antibiotic susceptibility testing. J. Clin. Microbiol. **16**:784-793.

Kronwall, G. 2000. MIC determination of fusidic acid and of ciprofloxacin using multidisk diffusion tests. Clin. Microbiol. Infect. **6**:483-489.

Levy, S.B. 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **36**:695-703.

Lewis, K. y Lomovskaya, O. 2002. Drug efflux, p. 61-90. En K. Lewis, A.A. Salyers, H.W. Taber y R.G. Wax (eds.), Bacterial resistance to antimicrobials. Marcel Dekker Inc., New York.

MacFarlane, G. 1985. Fleming (tomos 1 y 2). Salvat Editores S.A., Barcelona.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. Pearson Prentice Hall, Madrid.

Martínez, J.L. y Baquero, F. 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1771-1777.

Martínez, J.L. y Baquero, F. 2002. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:647-679.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement. Document M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Scheme for preparing dilutions of antimicrobial agents in agar dilution susceptibility tests, p. 108. Document M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Nijs, A., Cartuyvels, R., Mewis, A., Peeters, V., Rummens, J.L. y Magerman, K. 2003. Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3627-3630.

Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. 1999. Microbiología. McGraw-Hill/Interamericana de España, Madrid.

Partridge, S.R., Collins, C.M. y Hall, R.M. 2002. Class 1 integron containing a new gene cassette, *aadA10*, associated with Tn1404 from R151. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2400-2408.

Puertollano, M.A., Pérez-Toscano, M.T., Cruz-Chamorro, L., De Pablo, M.A. y Alvarez de Cienfuegos, G. 2003. New therapeutical agents applied in the elimination of resistant microorganisms: peptide antibiotics, p. 109-121. En G. Alvarez de

Cienfuegos, A. Ruiz-Bravo y M.A. de Pablo (eds.), New approaches in the use of antibiotics. Research Singpost, Trivandrum.

Rice, B.L., Sahm, D. y Bonomo, R.A. 2003. Mechanisms of resistance to antibacterial agents, p. 1074-1101. En P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller y R.H. Tenover (eds.), Manual of clinical microbiology. ASM Press, Washington.

Salyers, A.A. y Whitt, D.D. 2002. Bacterial pathogenesis. A molecular approach. ASM Press, Washington.

Steers, E., Folts, E.L. y Graves, G. 1959. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotic. *Antibiot. Chemother.* **9**:307-311.

Sydney, M., William, J. y Elvyn, G. 1978. Diagnostic microbiology. Mosby Company USA.

Turnidge, J., Ferraro, M.J. y Jorgensen, J.H. 2003. Susceptibility test methods: general considerations, p. 1102-1106. En P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller y R.H. Tenover (eds.), Manual of clinical microbiology (8^a ed.). ASM Press, Washington.

Umesaki, Y. y Setoyama, H. 2000. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Microb. Infect.* **2**:1343-1351.

Walsh, C. 2003. Antibiotics. Actions, origins, resistance. ASM Press, Washington.

Yao, J.D.C. y Moellering, R.C. 2003. Antibacterial agents, p. 1039-1073. En P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller y R.H. Tenover (eds.), Manual of clinical microbiology. ASM Press, Washington.