

CAPÍTULO 8

Aplicación del antibiograma en el diagnóstico de laboratorio veterinario

Fabiana Alicia Moredo

La elección del agente antimicrobiano adecuado para el tratamiento de animales que padecen una infección bacteriana es un tema complejo. Si bien los resultados de los diagnósticos bacteriológicos y las pruebas de sensibilidad antimicrobianas, orientan sobre los antimicrobianos potencialmente adecuados, las pruebas de sensibilidad antimicrobianas armonizadas, los criterios de interpretación veterinarios específicos y los rangos de control de calidad, que son esenciales para su realización *in vitro* y evaluar los resultados correspondientes, no están disponibles para todos los antimicrobianos, patógenos bacterianos, especies animales y sitios de infección de relevancia veterinaria. Además, el beneficio clínico de un agente antimicrobiano (definido como su eficacia *in vivo*) no depende exclusivamente de la sensibilidad *in vitro* del patógeno en estudio. Independientemente de la elección correcta de un fármaco antibacteriano con propiedades farmacocinéticas adecuadas y una formulación farmacéutica apropiada, el éxito del tratamiento depende sustancialmente de su uso adecuado. Incluso, si esto se asegura y se confirma la sensibilidad *in vitro*, una mejora insuficiente de los signos clínicos puede deberse a bacterias formadoras de biopelículas, persistentes o condiciones fisicoquímicas específicas en el sitio de la infección, como el valor de pH, la presión parcial de oxígeno y la tasa de perfusión (Richter, 2020).

En este capítulo se describirán los criterios de interpretación de resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana del CLSI y EUCAST.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana se encuentran entre los más importantes que emiten los laboratorios de microbiología clínica porque guían rutinariamente las decisiones críticas de tratamiento. Debido a la complejidad que reviste seleccionar un agente antimicrobiano apropiado para el tratamiento de una enfermedad infecciosa es importante considerar: si es necesario administrar una dosis de antibiótico más altas o más frecuentemente que lo habitual; si el antimicrobiano alcanzará la concentración necesaria en el sitio del organismo donde se localiza la infección; y si existe incertidumbre en los resultados de las pruebas debido a la variabilidad técnica que no se puede eliminar. El informe de los resultados y la interpretación de los mismos debe ser un trabajo conjunto entre profesionales veterinarios de laboratorio, sanitaristas, farmacólogos y clínicos.

Criterios de interpretación de las pruebas de sensibilidad antimicrobianas

Tanto EUCAST como CLSI utilizan las categorías "sensible" (S), "intermedio" (I) y "resistente" (R) y, hasta hace poco, también compartían sus definiciones. Durante el proceso internacional de promoción de las directrices EUCAST, se hizo evidente que no era posible una interpretación constructiva del significado de "intermedio". Al analizar la definición, quedó claro que había al menos tres partes no relacionadas reunidas en una: (i) el fármaco tiene un nivel de actividad antimicrobiana asociado a un efecto terapéutico incierto, (ii) una infección debida a un aislamiento puede ser tratada adecuadamente en regiones del cuerpo donde el fármaco se concentra físicamente o cuando se puede utilizar una dosis alta del fármaco, y (iii) una zona de amortiguamiento debe evitar que pequeños factores técnicos no controlados causen grandes discrepancias en las interpretaciones (Kahlmeter, 2019).

Tabla 1

Criterio de interpretación de resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobianas según el documento VET01S ED5:2020 del CLSI

Categoría	Definición
SENSIBLE	categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con CIM igual o inferior o un diámetro de halo de inhibición igual o superior al punto de corte sensible son inhibidos por las concentraciones generalmente alcanzables del antimicrobiano cuando se usa la dosis recomendada para tratar el sitio de infección, lo que resulta en probable eficacia clínica.
RESISTENTE	categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con CIM igual o superior o un diámetro de halo de inhibición igual o inferior al punto de corte resistente, no son inhibidos por las concentraciones generalmente alcanzables del antimicrobiano con esquemas de dosificación normales y/o que demuestran CIM o diámetros de inhibición que caen en el rango en el que son probables los mecanismos de resistencia microbianos específicos, y la eficacia clínica no se demostró de manera confiable en aislamientos con fenotipos similares.
INTERMEDIO	categoría definida por un punto de corte que incluye aislamientos con CIM o diámetros de halo de inhibición dentro del rango intermedio que se acercan a los niveles sanguíneos y tisulares usualmente alcanzables y/o para los cuales las tasas de respuesta pueden ser más bajas que para los aislamientos sensibles ¹ .
NO-SENSIBLE	categoría utilizada para aislamientos para los cuales solo se designa punto de corte sensible debido a la ausencia o rara ocurrencia de cepas resistentes. Los aislamientos para los cuales la CIM del antimicrobiano está por encima o los diámetros de halo de inhibición están por debajo del valor indicado para el punto de corte sensible, deben informarse como no sensibles ^{2,3} .

1. La categoría intermedia implica eficacia clínica en sitios anatómicos donde los medicamentos están fisiológicamente concentrados o cuando se puede usar una dosis más alta de lo normal de un medicamento. Esta categoría también sirve como una zona de amortiguamiento para la

variabilidad inherente en los métodos de prueba, lo que debería evitar que factores técnicos pequeños e incontrolados causen discrepancias importantes en las interpretaciones, especialmente para medicamentos con márgenes de farmacotoxicidad estrechos. 2. Un aislamiento que se interpreta como no sensible no significa necesariamente que tenga un mecanismo de resistencia. Es posible que los aislamientos con CIM por encima del punto de corte sensible que carecen de mecanismos de resistencia puedan encontrarse dentro de la distribución de tipo salvaje después del momento en que se estableció el punto de corte solo sensible. 3. El término "no sensible" no debe utilizarse cuando el texto describe una categoría de organismo/fármaco con categorías interpretativas intermedias y resistentes.

En principio, EUCAST evitó definir puntos de corte que dividieran las distribuciones de CIM de microorganismos que carecían de mecanismos de resistencia a un antimicrobiano determinado, debido a, en primer lugar, que no encontró evidencia que sugiriera que existe una correlación entre el resultado clínico y la CIM dentro de la distribución de fenotipo salvaje y, en segundo lugar, porque no sería posible lograr la reproducibilidad de los resultados de la prueba. Complementariamente, evitó definir una categoría intermedia si la exposición no podía aumentarse cambiando la dosis, la frecuencia o el modo de administración o porque el antimicrobiano se concentraría en el sitio de la infección como resultado de su farmacocinética. Finalmente, al publicar los regímenes de dosificación en los que se basaron los puntos de corte, como parte de la tabla de puntos de corte, aclaró que todos dependen de la dosis. Las dosis se sometieron a una consulta pública internacional en la que se pidió a los usuarios de los puntos de corte de EUCAST que se cercioraran de que las pautas nacionales de dosificación y las tradiciones coinciden o reemplazan la guía de EUCAST sobre "estándar" y "alta exposición" (Kahlmeter, 2019).

Como consecuencia, el Comité Directivo de EUCAST acordó redefinir las categorías sensible, intermedio y resistente, conservando las abreviaturas S, I y R. Esta decisión fue tomada en junio de 2018, luego de tres consultas (2015, 2017 y 2018) disponibles en el sitio web de EUCAST. Las nuevas definiciones son válidas desde 2019-01-01 (punto de corte EUCAST tabla v.9.0).

Tabla 2

Criterio de interpretación de resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobianas según EUCAST tabla v.9.0

Categoría (Abreviatura)	Definición
SENSIBLE, RÉGIMEN DE DOSIFICACIÓN ESTÁNDAR (S)	un microorganismo se clasifica como sensible, régimen de dosificación estándar ¹ , cuando existe una alta probabilidad de éxito terapéutico utilizando el régimen de dosificación estándar del antimicrobiano.
SENSIBLE, CON MAYOR EXPOSICIÓN (I)	un microorganismo se clasifica como sensible, con mayor exposición ¹ , cuando existe una alta probabilidad de éxito terapéutico debido a que la exposición al agente antimicrobiano aumenta al ajustar el régimen de dosificación o por su concentración en el sitio de la infección.
RESISTENTE	un microorganismo se clasifica como resistente cuando existe una alta probabilidad de fracaso terapéutico incluso cuando haya mayor exposición ¹ .

1. Exposición refiere al modo de administración, dosis terapéutica, intervalo de dosificación, tiempo de infusión, así como la distribución, el metabolismo y la excreción del agente antimicrobiano influirán en el microorganismo infectante en el sitio de la infección.

Selección de agentes antimicrobianos para realizar las pruebas de sensibilidad antimicrobianas y su informe

Agentes antimicrobianos apropiados para ser incluidos en las pruebas de rutina

Seleccionar los agentes antimicrobianos apropiados para probar e informar es una decisión que debe tomar cada laboratorio en consulta con veterinarios, profesionales de enfermedades infecciosas, farmacólogos clínicos y equipos de administración de antimicrobianos, si están disponibles. Las recomendaciones para cada grupo de organismos incluyen agentes antimicrobianos que muestran un rendimiento aceptable en las pruebas *in vitro*. Las consideraciones en la asignación de agentes antimicrobianos a grupos específicos de prueba/informe incluyen eficacia clínica, prevalencia de resistencia, minimización de la aparición de resistencia, costo, indicaciones clínicas de uso aprobadas por la agencia reguladora y recomendaciones de consenso actuales para agentes de primera elección y alternativos. Las pruebas de agentes seleccionados pueden ser útiles para fines de control y/o seguimiento de infecciones (CLSI, 2020).

Si bien hay agentes antimicrobianos que pueden probarse de manera rutinaria o selectiva, debe considerarse si están aprobados o no por las agencias o autoridades reguladoras en cada país ya que antimicrobianos que en algunos países pueden ser legales o estar permitidos, en otros no. Por ejemplo, en la República Argentina, el SENASA prohibió el uso de carbadox (Res. SENASA 57/16), cloranfenicol (Disposición 655 / 1988) y colistina (Res. SENASA 22/19) en animales de producción para consumo humano; en los Estados Unidos, AMDUCA el uso no prescripto de fluoroquinolonas y glicopéptidos en el mismo grupo de animales.

Agentes antimicrobianos equivalentes

Hay determinados antimicrobianos, en las tablas del CLSI se encuentran enumerados juntos en un solo recuadro, para los cuales las categorías interpretativas (sensible, intermedio o resistente) y la eficacia clínica son similares. Dentro de cada cuadro, un "o" entre antimicrobianos indica agentes para los cuales la resistencia y la sensibilidad cruzada son casi completas. Los resultados de un antimicrobiano conectado por un "o" se pueden usar para predecir los resultados del otro. Por ejemplo, las Enterobacteriales sensibles a la ampicilina pueden considerarse sensibles a la amoxicilina. Los resultados obtenidos de ampicilina podrían informarse junto con un comentario de que el aislamiento también es sensible a amoxicilina. Para los medicamentos conectados con "o", los errores mayores y muy importantes combinados son inferiores al 3 %, y los errores menores son inferiores al 10 %, según una gran población de bacterias analizadas. "O" también se usa para agentes comparables cuando se prueban contra organismos para los cuales se proporcionan puntos de corte "solo sensibles" (p. ej., ampicilina o amoxicilina con *Streptococcus canis*). Cuando ningún "o" conecta a los antimicrobianos dentro de un cuadro, los resultados no se pueden usar para predecir los de otro, debido a discrepancias o datos insuficientes.

Informe de resultados

Cada laboratorio debe decidir qué agentes antimicrobianos informar de forma rutinaria y cuáles solo de forma selectiva. Los resultados de los agentes antimicrobianos probados, pero no informados de forma rutinaria deben estar disponibles a pedido, o pueden informarse para tipos de muestras seleccionados.

Los clientes del laboratorio es responsable de garantizar que los compuestos se utilicen adecuadamente para las categorías de hospedadores de cada animal (p. ej., vacas lactantes, terneros) de acuerdo con la indicación aprobada.

Los valores de CIM pueden informarse directamente a los médicos con fines de atención al paciente. Sin embargo, para facilitar la comprensión del informe CIM, es esencial que también

se proporcione un resultado de categoría interpretativa (es decir, S, I o R). **Las mediciones de diámetro de zona sin una categoría interpretativa no deben informarse.**

Test/Report Group	Body Site	Antimicrobial Agent	Antimicrobial Agent Class/Subclass	Organism	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm			Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			Comments
						S	I	R	S	I	R	
Cats (Continued)												
A	UTI	Cefovecin	Cephalosporin III	<i>E. coli</i>	30 µg	≥ 24	21-23	≤ 20	≤ 2	4	≥ 8	
A	SST	Enrofloxacin	Fluoroquinolones ^c	Enterobacterales	5 µg	≥ 23	17-22	≤ 16	≤ 0.5	1-2	≥ 4	
A	SST	Marbofloxacin	Fluoroquinolones ^c	Enterobacterales	5 µg	≥ 20	15-19	≤ 14	≤ 1	2	≥ 4	
A	SST	Orbifloxacin	Fluoroquinolones ^c	Enterobacterales	10 µg	≥ 23	18-22	≤ 17	≤ 1	2-4	≥ 8	
A	Resp, skin	Pradofloxacin	Fluoroquinolones ^c	<i>E. coli</i>	5 µg	≥ 24	20-23	≤ 19	≤ 0.25	0.5-1	≥ 2	(20) Pradofloxacin breakpoints were determined using a dose of 3 mg/kg once daily of an oral tablet or 5 mg/kg once daily of an oral suspension for cats.

Imagen 1. Tabla 2A. Diámetros de halo de inhibición y puntos de corte de la CIM para Enterobacterales. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 5th Edition

Los laboratorios solo deben informar los resultados de los agentes antimicrobianos para los cuales se dispone de puntos de cortes según microorganismo, especie animal y proceso infeccioso. No es apropiado aplicar puntos de corte de CIM o de difusión en disco tomados de una tabla en la que el organismo no está incluido. Puede haber casos raros en los que un agente antimicrobiano para el que no existen puntos de corte CLSI (p. ej., tigeciclina) puede ser eficaz contra el organismo aislado. En estos casos, se debe consultar el prospecto del agente antimicrobiano.

La imagen 1, corresponde a una sección de la tabla 2A del documento CLSI VET01S ED5:2020 (acceso libre). A modo de ejemplo, se pueden observar los puntos de cortes para CIM y diámetros de halos de inhibición para determinar el comportamiento de diversos antimicrobianos frente a Enterobacterales aislados de infecciones del tracto urinario (UTI), piel y tejidos blandos (SST) y aparato respiratorio y piel de gatos.

Para determinados microorganismos, aún no se dispone de estudios adecuados para desarrollar estándares definitivos y reproducibles que permitan interpretar los resultados como *Mycoplasma*, y *Lawsonia intracellularis*. Estos microorganismos pueden necesitar diferentes medios, sustratos o atmósferas de incubación, o pueden mostrar una marcada variación de cepa a cepa en la tasa de crecimiento, por lo cual se recomienda la consulta con un especialista en enfermedades infecciosas para que oriente en la determinación de la necesidad de pruebas de

sensibilidad y en la interpretación de los resultados. Los informes publicados en la literatura médica veterinaria y las recomendaciones de consenso actuales para la terapia de microorganismos poco comunes, pueden descartar la necesidad de realizarlas. Si es necesario, el método de dilución suele ser el más apropiado, y esto puede requerir el envío del microorganismo a un laboratorio de referencia. Se debe informar a los veterinarios de las limitaciones de los resultados y recomendarles que los interpreten con precaución (CLSI, 2020).

Respuestas insuficientes o fracasos de tratamientos antimicrobianos

Las respuestas insuficientes a un tratamiento antimicrobiano o directamente su fracaso, pueden deberse a diversas circunstancias como son las interacciones entre los agentes antimicrobianos, los patógenos bacterianos y los animales enfermos y su comprensión es un tema importante en los intentos de optimizar la terapia antibacteriana en animales.

Richter y col. (2020) mencionan como principales motivos de respuesta insuficiente o fracaso de los tratamientos antimicrobianos a:

- Diagnóstico clínico inapropiado,
- Resistencia del patógeno bacteriano causante contra el agente antimicrobiano elegido,
- Falta de diagnóstico bacteriológico o identificación incorrecta del patógeno causante,
- Uso de criterios interpretativos incorrectos al evaluar los resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobianas,
 - Bajo valor predictivo de las pruebas de sensibilidad antimicrobianas con respecto a condiciones específicas en el sitio de infección,
 - Elección inadecuada de antimicrobianos con respecto a las propiedades farmacocinéticas y el sitio de infección,
 - Inicio tardío del beneficio malinterpretado como fracaso del tratamiento,
 - Deficiencia del sistema inmunitario del hospedador
 - Régimen de tratamiento subóptimo (inicio demasiado tarde, dosis incorrectas, vía de administración inadecuada, intervalos de dosificación demasiado largos, período de tratamiento demasiado corto),
 - Cumplimiento deficiente del propietario al administrar los agentes antimicrobianos,
 - Interacciones medicamentosas (administración combinada de diferentes antimicrobianos o coadministración de otros medicamentos),
 - Inactivación de fármacos antimicrobianos antes de su administración (por ejemplo, almacenamiento inadecuado).

Conclusión

Es importante destacar que, si bien las pruebas de sensibilidad antimicrobianas no imitan las condiciones *in vivo*, proporcionan resultados reproducibles que pueden correlacionarse con el resultado clínico, por lo cual ayudan al médico veterinario en la selección de los antimicrobianos apropiados para la implementación de la terapéutica. Teniendo esta consideración, una de las principales responsabilidades del laboratorio veterinario es seleccionar los agentes más apropiados para las pruebas y los informes de rutina.

Referencias

- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 5th ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2019. Redefining susceptibility testing categories S, I and R. <https://www.eucast.org/>
- Kahlmeter G, Giske CG, Kirn TJ, Sharp SE. 2019. Point-Counterpoint: Differences between the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations for reporting antimicrobial susceptibility results. *J Clin Microbiol.* 57:e01129-19. doi.org/10.1128/JCM.01129-19.
- Richter A, Feßler AT, Böttner A, Köper LM, Wallmann J, Schwarz S. 2020. Reasons for antimicrobial treatment failures and predictive value of in-vitro susceptibility testing in veterinary practice: An overview. *Vet Microbiol.* 245:108694. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108694.
- Toutain PL, Bousquet-Mélou A, Damborg P, Ferran AA, Mevius D, Pelligand L, Veldman KT, Lees P. 2017. En Route towards European Clinical Breakpoints for Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing: A Position Paper Explaining the VetCAST Approach. *Front. Microbiol.* 8:2344. doi: 10.3389/fmicb.2017.02344
- Watts JL, Sweeney MT. 2018. Antimicrobial susceptibility testing of bacteria of veterinary origin. *Microbiol Spectrum* 6(2):ARBA-0001-2017. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0001-2017

Conclusiones

La resistencia antimicrobiana (RAM) bajo el concepto de *Una Salud* compromete a la medicina veterinaria y es, según la *Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura* (FAO), uno de los grupos o sectores de interés por la influencia que tiene sobre el tema. Al esfuerzo de las organizaciones internacionales tales como la *Organización mundial de*

la Salud (OMS) y la *Organización de Sanidad animal* (OIE) que se alían para unificar conceptos, confeccionar listas de antimicrobianos que evolucionan en el tiempo según la emergencia de la RAM, proponiendo objetivos y estrategias para contenerla, se suman otros grupos de trabajo que evalúan el comportamiento de los antimicrobianos “*in vivo*” e “*in vitro*” para predecir su comportamiento y permitir prescribirlos de manera prudente y responsable. Así el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) son las dos instituciones más relevantes que ofrecen a través de sus estudios y métodos estandarizados de pruebas de sensibilidad antimicrobiana, herramientas de laboratorio que si bien no imitan las condiciones “*in vivo*”, proporcionan resultados reproducibles que se pueden correlacionar con el resultado clínico, y así ayudar al profesional de la salud en la selección de los antimicrobianos apropiados para la implementación de la terapéutica. En los laboratorios de medicina humana se utilizan desde hace muchos años los documentos del CLSI y EUCAST, mientras en medicina veterinaria es relativamente reciente su incorporación a la práctica. Numerosos son los estudios que se deben realizar para poder interpretar el comportamiento de una droga en animales, cuando hay diferentes especies y razas y más aún extrapolarlo a un sistema “*in vitro*”. Los avances en este campo han llevado a proponer por el CLSI estándares para medicina veterinaria y por el EUCAST a través del *Veterinary Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (VetCAST) documentos propios. Comprender los fundamentos de estas normas y poder llevarlas a la práctica en el laboratorio de diagnóstico veterinario de rutina es junto con otras prácticas responsables, involucrar a los médicos veterinarios en la contención de la RAM con la concepción de Una Salud.