

Alberto Tenorio-Abreu¹,
Jose María Eiros Bouza¹,
Esmeralda Rodríguez-
Molins¹
D. Andaluz Ojeda²,
Felipe Bobillo de Lamo²,
Marta Domínguez-Gil
González¹,
Raúl Ortiz de Lejarazu
Leonardo¹.

Variabilidad en la sensibilidad de tigeciclina frente a *Acinetobacter baumannii* en diferentes medios de cultivo

¹Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Avda. Ramón y Cajal nº3 47005 Valladolid.

²Servicio de Medicina Intensiva. Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Avda. Ramón y Cajal nº3 47005 Valladolid.

RESUMEN

Introducción. Tigeciclina puede suponer una alternativa terapéutica para el control de *A. baumannii* multirresistentes, si bien no existe consenso en cuanto a los puntos de corte de sensibilidad ni a la variabilidad de su CMI en función del medio de cultivo utilizado para realizar el antibiograma frente a este microorganismo. Por ello, nuestro objetivo ha sido verificar dicha variabilidad, así como proponer el medio de cultivo que más se aproxime al método estándar.

Métodos. Se seleccionaron 41 cepas de *A. baumannii* carbapenem-resistentes. Se analizó la sensibilidad frente a tigeciclina en diferentes medios de cultivo: Mueller Hinton agar comercial de Oxoid (MH-C); Mueller Hinton agar fresco de BD and Co, USA (MH-F) e ISO-sensitest agar en fresco de Oxoid, utilizando la técnica de E-test y disco. Las CMIs se compararon frente a las obtenidas mediante la técnica estándar de macrodilución.

Resultados. La CMI y halos de inhibición medios obtenidos en los diferentes medios de cultivos correspondieron a 9,26 mg/L y 15,1 mm de diámetro para MH-C; 1,71 mg/L y 22,7 mm para MH-F; 2,68 mg/L y 20,8 mm para ISO-sensitest. La CMI media obtenida mediante el método estándar de dilución fue de 0,47 mg/L (SD=0,21), con rango entre 0,25 a 1 mg/L.

Conclusión. En los tres medios de cultivo estudiados, se observan CMIs superiores al estándar, lo que supone interpretar falsas resistencias en muchos casos. No obstante, el medio que se aproxima más al de referencia es el MH-F.

Palabras clave: Tigeciclina, *Acinetobacter baumannii*, CMI.

Variability in the sensitivity to tigecycline against *Acinetobacter baumannii* in different culture medium

ABSTRACT

Introduction. The tigecycline may represent a therapeutic alternative for the control of multiresistant *A. baumannii*, although there is no consensus regarding the cutoff points for sensitivity or variability of MIC as a function of culture medium used for the antibiogram against this microorganism. Therefore, our objective was to verify this variability, and propose the culture medium that comes closest to the standard method.

Methods. We selected 41 strains of carbapenem-resistant *A. baumannii*. We analyzed the sensitivity to tigecycline in different culture medium: Mueller Hinton agar Oxoid commercial (C-MH), Mueller Hinton fresh agar BD and Co., USA (F-MH) and ISO-sensitest fresh agar Oxoid, using the E-test and disk. The MICs were compared against those obtained using the technique standard of macrodilution.

Results. The mean MIC and inhibition diameters obtained in the different culture medium corresponded to 9.26 mg/L and 15.1 mm in diameter for MH-C, 1.71 mg/L and 22.7 mm for MH-F; 2.68 mg/L and 20.8 mm for ISO-sensitest. Half the MIC obtained by the standard method of dilution was 0.47 mg/L (SD = 0.21), with values between 0.25 and 1 mg/L.

Conclusion. In the three growth media studied, MICs superior to the standard are observed, which is false to interpret resistance in many cases. However, the medium that comes closer more that of reference is the MH-F.

Keywords: Tigecycline, *Acinetobacter baumannii*, MIC.

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter baumannii es un patógeno asociado frecuentemente a infecciones nosocomiales, que cada vez más, son de mayor importancia en el ámbito hospitalario debido a la resistencia múltiple que presentan frente a la mayoría de los antibióticos. Debido a la aparición de cepas multirresistentes de difícil control, incluidas aquellas carbapenem-resistentes, *A.*

Correspondencia:
Dr. A. Tenorio Abreu.
Hospital Universitario de Canarias.
Carretera Cuesta-Taco S/N
38320 San Cristóbal de la Laguna (Tenerife)
Servicio de Microbiología.

Correo electrónico:
atenorio@hcuvsacyl.es

baumannii se ha convertido en uno de los microorganismos causantes de las infecciones nosocomiales más graves en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI)¹⁻³, como son las bacteriemias y neumonías asociadas a ventilación mecánica. Por ello, se plantea la necesidad de la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que permitan mejorar el control sobre este microorganismo. La molécula activa de tigeciclina es un derivado tetracíclico, aprobado por la FDA en el año 2005 (Food and Drug Administration) para el tratamiento de infecciones complicadas de piel y tejidos blandos⁴, y en la actualidad son numerosos los autores que apoyan su aplicación para el tratamiento de infecciones respiratorias⁵⁻⁷ bacterianas debido a su amplio espectro de acción y a su buena perfusión en el tejido pulmonar. Tigeciclina puede suponer una alternativa terapéutica para el tratamiento de *A. baumannii*, si bien no existe consenso en cuanto a los puntos de corte de sensibilidad ni a la variabilidad de su CMI en función del medio de cultivo y de la técnica utilizada para realizar el antibiograma frente a este microorganismo. Siendo uno de los principales motivos de esta variabilidad, la concentración de ciertos cationes metálicos presentes en los diferentes medios de cultivo, principalmente el manganeso⁸. El objetivo propuesto ha sido verificar la variabilidad de la CMI de tigeciclina frente a *A. baumannii* utilizando tres medios de cultivos convencionales, así como proponer el uso del medio de cultivo de mejor correlación con el método estándar de "macrodilución en caldo".

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron 41 cepas de *A. baumannii* carbapenem-resistentes procedentes de pacientes distintos ingresados en la unidad de cuidados intensivos, tomados entre el periodo de Octubre del 2008 hasta Enero del 2009. Dichas cepas fueron identificadas por el Servicio de Microbiología, y a la misma vez estudiado sus perfiles de susceptibilidad a diferentes antibióticos mediante el sistema comercial Wider (F. S. Melguizo SA). Todas las cepas fueron resistentes mediante el sistema de microdilución de Wider, a todos los beta-lactámicos incluidos los carbapenems, a los aminoglucósidos, quinolonas y

macrólidos. Las 41 cepas seleccionadas mostraron sensibilidad a la colistina en microdilución y a rifampicina mediante la técnica de difusión en disco. Posteriormente se analizó la sensibilidad frente a tigeciclina en tres tipos de medios de cultivos: Mueller Hinton agar preparado comercial de Oxoid (MH-C); Mueller Hinton agar fresco de BD and Co, USA (MH-F) e ISO-sensitest agar en fresco de Oxoid, utilizando la técnica de E-test y de difusión en disco (TGC 15 µg de Oxoid) para cada medio de cultivo. Se realizó una primera lectura del antibiograma a las 24 horas y una segunda a las 48 horas tras incubación a 37°C en aerobiosis. Las CMIs se compararon frente a las obtenidas mediante la técnica estándar de macrodilución en caldo Mueller Hinton. La técnica de macrodilución se preparó utilizando sustancia pura valorada del compuesto activo tigeciclina de Wyeth Farma. Para este método se siguieron las normas recomendadas por el CLSI del documento M7-A7⁹. Las concentraciones de antibiótico que se utilizaron para esta técnica fueron de 8, 4, 2, 1, 0,5 y 0,25 mg/L, y se añadió un séptimo y octavo tubo como control positivo de crecimiento y control negativo, respectivamente. El inóculo utilizado en cada tubo fue de 10⁵-10⁶ UFC/ml calculado con un nefelómetro de turbidez McFarland. Dicho inóculo se preparó a partir de colonias aisladas de 24 horas de cultivo y suspendidas en solución salina al 0.9%. Los puntos de corte utilizados para la determinación de la sensibilidad de tigeciclina frente a *A. baumannii*, fueron los recomendados por el BSAC¹⁰ (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) que correspondieron a ≤1 mg/L =Sensible, 2 mg/L =Intermedio, >2 mg/L =Resistente. Para el cálculo de los promedios y desviaciones estándar se utilizó el paquete estadístico incluido en el programa Microsoft Office 2007, y para el cálculo de correlaciones se utilizó el programa estadístico informático SPSS versión 15.0.

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 41 cepas de *A. baumannii*. A las 24 horas de incubación, mediante MH-C, con el método de E-test, 8 aislados presentaron CMI de 16 mg/L, 30 una CMI de 8 mg/L, y 3 una CMI de 4 mg/L, siendo la media de 9,26 mg/L

CMI (mg/L)	Diferencias en la interpretación de la susceptibilidad en función del medio de cultivo utilizado para el análisis de tigeciclina.							
	MH-C		MH-F		ISO-sensitest		Macrodilución en caldo	
	n	Categoría	n	Categoría	n	Categoría	n	Categoría
0,25	-	-	-	-	-	-	13	S
0,5	-	-	1	S	-	-	24	S
1	-	-	10	S	2	S	4	S
2	-	-	30	I	24	I	-	-
4	3	R	-	-	15	R	-	-
8	30	R	-	-	-	-	-	-
12	8	R	-	-	-	-	-	-

S, sensible (≤1 mg/L); I, intermedio (=2 mg/L); R, resistente (>2 mg/L).

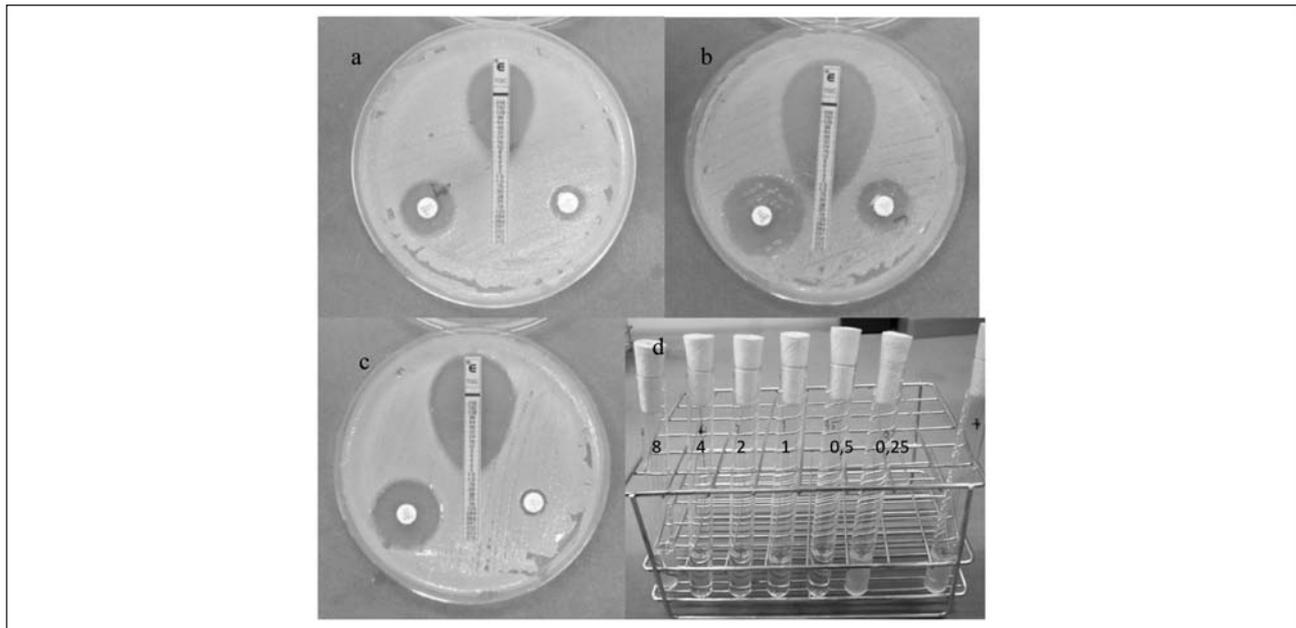


Figura 1

Ejemplo de variabilidad de la CMI de una misma cepa utilizando diferentes medios de cultivo y sistemas. a) MH-C; b) MH-F; c) ISO-sensitest; d) sistema de macrodilución en caldo. Se observa que en el medio MH-F (b) los halos son mayores.

(SD=3,51). Con el mismo medio y el método de difusión en disco, 21 aislados presentaron un halo de inhibición de 14 mm de diámetro, 17 un halo de 16 mm y 3 con un halo de 18 mm, con una media de 15,1 mm (SD=1,26). Mediante MH-F en E-test, 30 aislados presentaron una CMI de 2 mg/L, 10 una CMI de 1 mg/L, y 1 una CMI de 0,5 mg/L, siendo la media de 1,71 mg/L (SD=0,47). Con el método de difusión en disco, 3 aislados presentaron un halo de inhibición de 20 mm, 23 un halo de 22 mm, 12 un halo de 24 mm y 3 un halo de 26 mm, con una media de 22,7 mm (SD=1,46). Por el método E-test en medio ISO-sensitest, 2 aislados presentaron CMI de 1 mg/L, 24 aislados una CMI de 2 mg/L, y 15 aislados presentaron una CMI de 4 mg/L, con una CMI media de 2,68 mg/L (SD=1,03). Con el método de difusión en disco, 26 aislados mostraron un halo de 20 mm, 13 un halo de 22 mm y 2 aislados un halo de 24 mm, con una media de 20,83 mm (SD=1,18). La tabla 1 muestra las diferencias en interpretación de sensibilidad por la influencia de los diferentes medios de cultivo utilizados.

A las 48 horas de incubación, la CMI media en MH-C se incrementó en 1,66 mg/L, en MH-F se incrementó en 0,79 mg/L, en ISO-sensitest en 0,28 mg/L y por macrodilución se incrementó en 0,15 mg/L.

Con el método de referencia de macrodilución en caldo, todas las cepas presentaron una CMI ≤ 1 mg/L, considerándose el 100% sensibles según los criterios establecidos, con un rango de CMI de entre 0,25 a 1 mg/L y una media de 0,47 mg/L (SD=0,21). Mediante MH-C con el método E-test, el 100% de las cepas se presentaron resistentes, y ninguna cepa presentó CMI sensible ni intermedia. Con el medio MH-F y método E-test, el 30% de las cepas fueron sensibles, con CMIs iguales o

menores a 1 mg/L, y el 70% de las cepas se mostraron con sensibilidad intermedia con CMI de 2 mg/L, ninguna cepa se mostró resistente con este medio. El 5% de las cepas fueron sensibles con el método E-test en el medio ISO-sensitest, el 59% fueron intermedios, y el 36% se mostraron resistentes. La figura 1 muestra con un ejemplo, la variabilidad de CMI en una misma cepa utilizando los diferentes medios de cultivo.

La mejor correlación hallada con el método estándar de macrodilución correspondió al medio MH-F ($R=0,443$; $P=0,004$), con una diferencia en la media de CMI de 1,25 mg/L. La correlación con el medio MH-C fue de 0,323 ($P=0,039$), con una diferencia en la media de CMI de 8,79 mg/L. Por último, la correlación con el medio ISO-sensitest fue de 0,384 ($P=0,013$), con 2,21 mg/L de diferencia entre las medias de sus CMIs.

En relación a la correlación del método E-test en comparación al método de difusión en disco, el medio MH-F presentó la mejor correlación ($R=0,775$; $P<0,0001$), el medio ISO-sensitest presentó una correlación intermedia de 0,638 ($P<0,0001$), y el medio MH-C presentó una baja correlación entre ambos métodos ($R=0,412$; $P=0,07$).

DISCUSIÓN

En los tres medios de cultivo estudiados, se observan CMIs superiores a las halladas por el método estándar. Con los datos obtenidos, se muestra una gran variabilidad de las CMI en función del medio de cultivo utilizado para el estudio de la sensibilidad de *A. baumannii* frente a tigeciclina. Algunos autores refieren este hecho, a la concentración de manganeso⁸ existente en el medio de cultivo, a mayor concentración mayor

inactivación del antibiótico. En el presente estudio, los medios frescos (MH-F e ISO-sensitest) presentaron una mayor correlación con el método estándar que el medio comercial (MH-C), debido probablemente a la deshidratación parcial que sufre el medio desde que se elabora hasta que es utilizado en el laboratorio, concentrándose los iones manganeso durante el tiempo en stock.

Las correlaciones con E-test de los distintos medios de cultivo con el método estándar de dilución, fueron en general bajas, siendo el MH-F, el medio que presentó una mejor correlación (0,443), seguido del ISO-sensitest (0,384), y en último lugar, el MH-C (0,323). Las diferencias entre las CMI medias del método estándar con los diferentes medios de cultivo fueron muy superiores con el medio MH-C (8,79 mg/L) que con el medio MH-F (1,25 mg/L) e ISO-sensitest (2,21 mg/L). Con los hallazgos obtenidos, se observa que el medio de cultivo de mejor correlación y mayores parecidos en sus CMI con el método estándar, fue el MH-F, seguido del ISO-sensitest. MH-C se presenta como un medio excesivamente discordante con el método de dilución.

Por otra parte, el tiempo de incubación previo a la lectura del antibiograma influye en la CMI obtenida, influyendo en mayor medida en el MH-C, y en menor medida en el ISO-sensitest entre los medios sólidos, presentándose una variación menor en el medio líquido. Esta variabilidad dependiente del tiempo de lectura, es de especial importancia en aquellos laboratorios donde no existe asistencia continuada durante los fines de semana y festivos, obligándose la lectura a las 48-72 horas, pudiéndose informar de falsas resistencias frente a una posible alternativa para combatir *A. baumannii*, microorganismo que de inicio, presenta pocas opciones terapéuticas.

Considerando como método de referencia la dilución en caldo y aplicando los puntos de corte de susceptibilidad propuesto por el BSAC, existe un alto porcentaje de errores en la interpretación de los resultados con los tres medios de cultivo utilizados, apareciendo una alta tasa de falsas resistencias. Mediante dilución el 100% de las cepas se mostraron sensibles, mientras que con MH-C todas las cepas se mostraron resistentes. En este sentido, el medio MH-F fue el que mostró un mayor parecido en comportamiento al método estándar, con un porcentaje del 30% de cepas sensibles y un 70% de cepas intermedias. Los resultados intermedios correspondieron al medio ISO-sensitest, con la mayoría de sus cepas con sensibilidad intermedia.

No existen estudios previos de iguales características al presente para contrastar nuestros hallazgos de forma paralela. Aunque si existen algunos semejantes, como un estudio multicéntrico español de reciente publicación, en el que estudia una serie de 148 aislados de *Acinetobacter* spp, comparando las CMI de tigeciclina mediante el método E-test y microdilución en caldo como *gold standar*, en el cual refieren un alto porcentaje de falsas resistencias por el método E-test (93%)¹¹. En otra serie española, también se comunica una alta variabilidad de CMI de tigeciclina frente a *A. baumannii* utilizando Mueller-Hinton de diferentes casas comerciales,

aunque no se compara con un método estándar¹².

En conclusión, podemos apuntar que se ha confirmado una alta variabilidad de la CMI de tigeciclina frente a *A. baumannii* según el medio de cultivo utilizado, apareciendo un alto porcentaje de falsas resistencias en MH-C e ISO-sensitest, siendo especialmente notable con el medio MH-C. Por este motivo, se ha de tener especial cuidado en la interpretación de la sensibilidad del antibiótico cuando se utilice un medio sólido. Con los hallazgos obtenidos en la presente serie, podemos proponer el uso de MH-F en la práctica clínica por su mejor correlación con el método estándar. Aunque, en cualquier caso, serán necesarios otros estudios complementarios que relacionen los datos de CMI obtenidos *in vitro* con el éxito terapéutico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con la colaboración de laboratorios Pfizer.

BIBLIOGRAFÍA

1. Shorr AF. Review of studies of the impact on Gram-negative bacterial resistance on outcomes in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2009;37(4):1463-9.
2. Giannouli M, Tomasone F, Agodi A, Vahaboglu H, Daoud Z, Triassi M et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. *Antimicrob Chemother* 2009;63(4):828-30.
3. Daniels TL, Deppen S, Arbogast PG, Griffin MR, Schaffner W, Talbot TR. Mortality rates associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in surgical intensive care units. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29(11):1080-1083.
4. Oliva ME, Rekha A, Yellin A, Pasternak J, Campos M, Rose GM et al. A multicenter trial of the efficacy and safety of tigecycline versus imipenem/cilastatin in patients with complicated intra-abdominal infections [Study ID Numbers: 3074A1-301-WW; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00081744]. *BMC Infect Dis* 2005 19;5:88.
5. Curcio D, Fernández F, Vergara J, Vazquez W, Luna CM. Late onset ventilator-associated pneumonia due to multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. :experience with tigecycline. *J Chemother* 2009;21(1):58-62.
6. Dizbay M, Altuncecik A, Sezer BE, Ozdemir K, Arman D. Colistin and tigecycline susceptibility among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from ventilator-associated pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32(1):29-32.
7. Koomanachai P, Kim A, Nicolau DP. Pharmacodynamic evaluation of tigecycline against *Acinetobacter baumannii* in a murine pneumonia model. *J Antimicrob Chemother* 2009;63(5):982-987.
8. Fernández-Mazarrasa C, Mazarrasa O, Calvo J, del Arco A, Martínez-Martínez L. High concentrations of manganese in Mueller-Hinton agar increase MICs of tigecycline determined by Etest. *J Clin Microbiol* 2009;47(3):827-829.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilu-*

tion Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically-Seven Edition: Approved Standard M7-A7. CLSI, Wayne, PA, USA, 2006.

10. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. http://www.bsac.org.uk/susceptibility_testing/breakpoints.cfm (Accedido el 20 Febrero 2009).
11. Casal M, Rodríguez F, Johnson B, Garduno E, Tubau F, Ortiz de Lejarazu R et al. Influence of testing methodology on the tigecycline activity profile against presumably tigecycline-non-susceptible *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64:69-72.
12. Camarena JJ, González R, Zaragoza R, Navarro J, Sancho S, Nogueira JM. Actividad in vitro de tigeciclina frente *Acinetobacter baumannii*: variaciones de CMI por E-test dependientes del tipo de medio Mueller-Hinton II utilizado en rutina. Abstract 025. *Enf Infect Microbiol Clin* 2007;25 Suppl:58.