

L. Martínez-Lamas  
M. Treviño Castellano  
P. A. Romero-Jung  
B. J. Regueiro García

# Comparación entre el sistema Phoenix y métodos basados en agar para el ensayo de sensibilidad a antibióticos en *Streptococcus* spp.

Servicio de Microbiología  
Complejo Hospitalario Universitario  
Santiago de Compostela (La Coruña)

**Introducción.** La resistencia a los antibióticos en el grupo de los estreptococos es un problema emergente de especial importancia en las infecciones graves. El sistema automatizado BD Phoenix para identificación y antibiograma es un instrumento diagnóstico recientemente disponible que permite obtener resultados en 12 h.

**Métodos.** Se ha llevado a cabo un estudio comparativo entre el sistema BD Phoenix con paneles SMIC/ID-9 y el método disco-difusión para la realización de estudios de sensibilidad a antibióticos. Se utilizaron 200 aislamientos clínicos de estreptococos: beta-hemolíticos (n=65), viridans (n=87) y *Streptococcus pneumoniae* (n=48).

**Resultados.** De forma global, en relación con el método disco-difusión, hubo un acuerdo entre categorías superior al 96,7% (94,8% en beta-hemolíticos y 97,9% en viridans). Las tasas de errores menores fueron inferiores al 10% para todos los antibióticos. El mayor porcentaje de errores graves correspondió a eritromicina y clindamicina dentro del grupo de los beta-hemolíticos (14,7%). El porcentaje global de errores muy graves fue inferior al 0,5%. Los resultados para penicilina en estreptococos viridans y *S. pneumoniae* presentaron un acuerdo entre categorías del 89,7 y 91,7% frente a Etest, respectivamente.

**Conclusiones.** El sistema automatizado BD Phoenix es un instrumento diagnóstico de gran utilidad y efectividad para el ensayo cuantitativo de la sensibilidad a los antibióticos en el grupo de los estreptococos.

**Palabras clave:**  
*Streptococcus*. Antibiograma. Phoenix. Disco-difusión. Etest.

Rev Esp Quimioter 2008;21(3):184-188

## Comparison between Phoenix system and agar-based methods for antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus* spp.

**Introduction.** Antibiotic resistance is an emerging problem among streptococcal species, especially for severe infections. Automated diagnostic systems for antimicrobial susceptibility testing, such as BD Phoenix, is a recently available instruments that makes it possible to obtain results within 12 h.

**Methods.** Antimicrobial susceptibility testing results of the BD Phoenix system were compared to those obtained from Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) disk-diffusion method. Two-hundred different clinical isolates of streptococci were assayed: beta-hemolytic (n=65), viridans (n=87), *S. pneumoniae* (n=48).

**Results.** Overall, there was categorical agreement greater than 96.7% (94.8% for beta-hemolytic and 97.9% for viridans group) in relationship to the disk-diffusion method. The minor error rates were less than 10% for all the antibiotics. The greatest percentage of serious errors corresponded to erythromycin and clindamycin within the beta-hemolytic group (14.7%). Overall percentage of very serious errors was less 0.5%. The results for penicillin in viridans streptococci and *S. pneumoniae* results showed 89.7% and 91.7% of categorical agreement, respectively, using the Etest as reference.

**Conclusions.** The automated BD Phoenix system is a very useful and effective diagnostic tool for quantitative testing of sensitivity to antibiotics in the streptococci group.

**Key words:**  
*Streptococcus*. Antimicrobial susceptibility testing. Phoenix. Disk-diffusion. Etest.

Correspondencia:  
Mercedes Treviño Castellano  
Servicio de Microbiología  
Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela  
Travesía Choupana, s/n  
15706 Santiago de Compostela (La Coruña)  
Correo electrónico: mtreccas@terra.es

## INTRODUCCIÓN

El aumento de la resistencia de los estreptococos a las distintas clases de antibióticos es un hecho constatado en todo el mundo<sup>1</sup>. Con cierta frecuencia se detecta sensibilidad disminuida o resistencia a penicilina y macrólidos en es-

te grupo de microorganismos; se ha descrito también frente a fluoroquinolonas<sup>2,3</sup>.

Dado que los aislamientos clínicos de este grupo de bacterias pueden estar implicados en infecciones graves (sepsis, endocarditis, meningitis, osteomielitis, infección grave de la piel y tejidos blandos y neumonías), es de especial interés disponer de métodos que permitan de forma rápida y fiable llevar a cabo la identificación y el antibiograma. El uso del método de disco-difusión es limitado ya que no proporciona resultados cuantitativos, además de no tener definidos puntos de corte para penicilina y ampicilina en estreptococos del grupo viridans<sup>4</sup>. Los paneles del sistema Phoenix, basados en el método de microdilución, ofrecen resultados cuantitativos en un máximo de 12 h. Los sistemas automatizados pueden ser la mejor elección para conseguir simultáneamente reproducibilidad, exactitud, rapidez, disponibilidad de los datos para estudios estadísticos y epidemiológicos y buena relación coste-efectividad.

El presente estudio se ha diseñado para comparar los resultados obtenidos por el sistema Phoenix y el método de disco-difusión, muy utilizado en la rutina de los laboratorios de Microbiología Clínica. Para evaluar los resultados de penicilina en el grupo viridans y *Streptococcus pneumoniae* la comparación se estableció con Etest.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Bacterias

Se ensayaron 200 aislamientos de estreptococos obtenidos de muestras clínicas. La identificación a nivel de especie se llevó a cabo mediante sensibilidad a optoquina y SMIC/ID-9 (Becton-Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD). Los estreptococos beta hemolíticos fueron seroagrupados por aglutinación mediante Strepto kit (BioMérieux, France).

### Antibiogramas por el sistema BD Phoenix

Se realizaron utilizando los paneles SMIC/ID-9 en el sistema BD Phoenix (Becton-Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD) según las condiciones propuestas por el fabricante.

### Antibiogramas por el método disco-difusión

Se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>4</sup>. Los antibióticos ensayados fueron penicilina, eritromicina, clindamicina, levofloxacino y vancomicina para *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus dysgalactiae*; y cefotaxima, eritromicina, clindamicina, levofloxacino, vancomicina y teicoplanina para el resto de los estreptococos

estudiados (cefotaxima no se ensayó en *S. pneumoniae*). Los discos de eritromicina y clindamicina se dispusieron de acuerdo con las directrices del CLSI para detectar la resistencia inducible a este último antibiótico.

### Estudio de sensibilidad a penicilina

En el grupo viridans y *S. pneumoniae* se realizó mediante Etest (ABBIODISK, Solna, Suecia). También cefotaxima fue ensayada por este método en el caso de *S. pneumoniae*.

### Análisis de los datos y discrepancias

El método disco-difusión, de acuerdo con los criterios del CLSI, se consideró como método de referencia. Los resultados se clasificaron en las categorías de sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) de acuerdo con los criterios del CLSI<sup>4</sup>. Los resultados discordantes fueron reanalizados por Etest según las especificaciones del fabricante. En el caso de penicilina y cefotaxima en *S. pneumoniae* los resultados discrepantes se repitieron

Tabla 1		Aislamientos de estreptococos investigados en este estudio	
	Organismo	N.º de aislamientos	
<b>Beta hemolíticos de colonia grande (n=65)</b>			
	<i>Streptococcus pyogenes</i> (grupo A)	34	
	<i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B)	27	
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (grupo C)	3	
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (grupo C)	1	
<b>Grupo viridans (n = 135)</b>			
Grupo mitis (n = 81)			
	<i>S. mitis</i>	22	
	<i>S. sanguinis</i>	1	
	<i>S. oralis</i>	7	
	<i>S. parasanguinis</i>	3	
	<i>S. pneumoniae</i>	48	
Grupo anginosus (n = 40)			
	<i>S. anginosus</i>	28	
	<i>S. constellatus</i>	8	
	<i>S. intermedius</i>	4	
Grupo salivarius (n = 2)			
	<i>S. salivarius</i>	2	
Grupo bovis			
		2	
	<i>Streptococcus</i> spp. alfa hemolíticos	10	
	Total	200	

por Vitek 2 con la tarjeta AST-P561. Los conceptos utilizados fueron los siguientes: acuerdo de categoría (AC): ambos métodos concuerdan en la categoría interpretativa CLSI; error menor (EM): el método de referencia es R o S y el Phoenix I, y viceversa; error grave (EG): el método de referencia es S y el Phoenix R; error muy grave (EMG): el método de referencia es R y el Phoenix S; acuerdo esencial (AE): los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) del panel están en el rango  $\pm 1$  dilución respecto al método de referencia.

## Control de calidad

Como cepa de control de calidad se usó *S. pneumoniae* ATCC 49619.

## RESULTADOS

Las especies bacterianas ensayadas se listan en la tabla 1 agrupadas de acuerdo con los criterios taxonómicos basados en el análisis del 16S ARN-r<sup>5</sup>.

Las tablas 2 y 3 muestran el comportamiento del sistema Phoenix para los distintos antimicrobianos frente al método disco-difusión según los distintos grupos y especies de estreptococos. Globalmente, el acuerdo entre categorías fue del 96,7% (94,8% en betahemolíticos y 97,9% en viridans). Individualmente, el AC fue superior al 90% en todos los antibióticos, a excepción de eritromicina y clindamicina en *S. pyogenes*, caso en el que hubo un porcentaje de errores

graves y muy graves elevado (14,7 y 2,9%, respectivamente). Dentro del grupo de los estreptococos viridans y *S. pneumoniae* los valores de los distintos tipos de errores fueron bajos y conforme a los criterios de la Food and Drug Administration (FDA)<sup>9</sup>. En el grupo viridans se detectó un 4% de errores graves para levofloxacino.

En lo que respecta a los betalactámicos, los resultados se muestran en la tabla 4. En el grupo de estreptococos viridans el acuerdo entre categorías fue del 89,7%. Se encontraron ocho errores menores (tres en *S. mitis*, dos en *S. oralis*, dos en *S. anginosus* y uno en *Streptococcus spp.* grupo viridans) y un error muy grave (*S. mitis*). El acuerdo esencial fue del 93%.

En *S. pneumoniae* el AC para penicilina fue del 91,7%. Inicialmente se obtuvieron 14 discrepancias entre las categorías susceptible/intermedia, de las que 10 se resolvieron por Vitek. Para cefotaxima el AC fue del 96% y el AE del 92%.

## DISCUSIÓN

Los aislamientos ensayados en este estudio, todos de origen clínico, representan una amplia gama de especies y patrones de susceptibilidad.

En relación con el método de disco-difusión, globalmente, se encontró un acuerdo entre categorías superior al 90%, considerado habitualmente marcador de buena concordancia<sup>6,8</sup>. Se han publicado resultados similares por parte de

Tabla 2

Concordancia entre los resultados del antibiograma por el sistema Phoenix y el método disco-placa CLSI en el grupo de estreptococos betahemolíticos

Organismo	Antibiótico	Susceptibilidad (N.º)			Acuerdo de categoría	Errores menores	Errores graves	Errores muy graves
		S	I	R	(%)	N.º (%)	N.º (%)	N.º (%)
<i>S. pyogenes</i>	Penicilina	34	0	0	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Eritromicina	26	0	8	82,4	0 (0)	5 (14,7)	1 (2,9)
	Clindamicina	31	0	3	82,4	0 (0)	5 (14,7)	1 (2,9)
	Levofloxacino	34	0	0	91,2	3 (8,8)	0 (0)	0 (0)
	Vancomicina	34	0	0	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>S. agalactiae</i>	Penicilina	27	0	0	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Eritromicina	19	2	6	96,3	1 (3,7)	0 (0)	0 (0)
	Clindamicina	21	2	4	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Levofloxacino	27	0	0	96,3	1 (3,7)	0 (0)	0 (0)
	Vancomicina	27	0	0	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>S. dysgalactiae</i>	Penicilina	4	0	0	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Eritromicina	1	0	3	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Clindamicina	1	0	3	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Levofloxacino	4	0	0	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Vancomicina	4	0	0	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Organismo	Antibiótico	Susceptibilidad (N.º)			Acuerdo de categoría	Errores menores	Errores graves	Errores muy graves
		S	I	R	(%)	N.º (%)	N.º (%)	N.º (%)
Grupo viridans	Eritromicina	53	2	32	94	2 (2,5)	3 (3,5)	0 (0)
	Clindamicina	64	0	23	95	0 (0)	2 (2,5)	2 (2,5)
	Levofloxacino	85	0	2	95	1 (1)	3 (4)	0 (0)
	Teicoplanina	87	0	0	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Vancomicina	87	0	0	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>S. pneumoniae</i>	Cefotaxima	84	1	2	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Eritromicina	35	0	13	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Clindamicina	39	0	9	98	1 (2)	0 (0)	0 (0)
	Levofloxacino	48	0	0	98	1 (2)	0 (0)	0 (0)
	Vancomicina	48	0	0	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)

otros autores, aunque comparando el sistema Phoenix con otros métodos, tales como Etest o microdilución<sup>2,7</sup>.

Unos resultados aceptables exigen un porcentaje de errores menores, graves y muy graves inferior al 1,5, 3 y 10%, respectivamente<sup>9</sup>. De forma general, los resultados obtenidos fueron aceptables excepto para el caso de eritromicina y clindamicina en *S. pyogenes* (14,7% de errores graves). El porcentaje de errores muy graves se debió a un solo aislamiento. Esta peor respuesta no parece estar relacionada con la expresión de fenotipo inducible ya que la mayoría de las discrepancias para estos dos antibióticos se deben a errores mayores, es decir, resistencias obtenidas por Phoenix que se corresponden con resultados de sensibilidad por disco-difusión. Únicamente en dos aislamientos de *S. pyogenes*, un *S. mitis* y un *S. oralis* el error cometido se relacionó con un fenotipo de resistencia inducible a clindamicina. Otros autores<sup>10</sup> han publicado resultados similares. Aunque se detectaron tres errores graves frente a levofloxacino en el grupo viridans, no se encontró ninguno muy grave.

Los resultados respecto a betalactámicos son muy satisfactorios para cefotaxima, si bien se han analizado pocos

aislamientos resistentes ya que se trata de un fenotipo muy poco frecuente.

Para los estreptococos del grupo viridans los valores de AC para penicilina fueron próximos al 90% (89,7%), similares a los obtenidos por otros investigadores<sup>10</sup>. No obstante, el AE fue del 93%, superior al umbral del 90% propuesto como requisito de aceptación de un sistema para realizar antibiogramas<sup>9</sup>.

En cuanto a *S. pneumoniae*, no se detectó ningún error grave o muy grave y las discrepancias entre métodos se debieron mayoritariamente a valores de CMI más elevados por el sistema Phoenix. Esta tendencia ya ha sido constatada en otros trabajos<sup>7,11</sup>.

Los resultados para cefotaxima fueron satisfactorios, con un AC del 96% y un AE del 92%, en concordancia con otros estudios<sup>7,10,11</sup>.

Finalmente, hemos de tener en cuenta, a la hora de valorar estos resultados, que estamos contrastando un método basado en dobles diluciones con otro lineal cuyos resultados no son directamente comparables en muchos casos, que

Organismo	Antibiótico	Susceptibilidad (N.º)			Acuerdo de categoría	Errores menores	Errores graves	Errores muy graves
		S	I	R	(%)	N.º (%)	N.º (%)	N.º (%)
Grupo viridans	Penicilina	68	14	5	89,7	8 (9,2)	0 (0)	1 (1,1)
<i>S. pneumoniae</i>	Penicilina	33	10	5	91,7	4 (8,3)	0 (0)	0 (0)
	Cefotaxima	45	1	2	96	2 (4)	0 (0)	0 (0)

puede causar discrepancias importantes en las CMI con valores próximos a los puntos de corte entre categorías.

En conclusión, el sistema Phoenix es de gran interés y efectividad desde el punto de vista microbiológico en lo que respecta a las infecciones causadas por estreptococos. Los paneles del sistema Phoenix presentan ventajas respecto al método disco-placa, ya que éste ofrece valores cuantitativos en un plazo de tiempo inferior a 12 h. Además, en el caso del grupo viridans los valores de CMI permiten interpretar los resultados para penicilina, cosa que no es posible informar con el método de disco-difusión. Todo ello es muy importante en infecciones graves, especialmente aquellas causadas por especies agresivas, tales como *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *S. agalactiae*.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Gordon KA, Beach ML, Biedenbach DJ, Jones RN, Rhomberg PR, Mutnik AH. Antimicrobial susceptibility patterns of  $\beta$ -haemolytic and viridans group streptococci: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:57-162.
2. Brigante GR, Luzzaro FA, Pini B, Lombarda G, Sokeng G, Toniolo AQ. Drug susceptibility testing clinical isolates of streptococci and enterococci by the Phoenix automated microbiology system. *BMC Microbiology* 2007;7:46.
3. Biedenbach D, Toleran MA, Walsh TR, Jones RN. Characterization of fluoroquinolone-resistant  $\beta$ -haemolytic *Streptococcus* spp. isolated in North America and Europe including the first report of fluoroquinolone resistant *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;55:119-27.
4. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement M100-S17. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2007.
5. Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*. En: Murray PR, editor. *Manual of clinical microbiology*, vol 1. Washington: ASM Press, 2007; p. 412-29.
6. Thornsberry C, Anhalt JP, Washington II JA, McCarthy LR, Schoenkech FD, Sherris JC, et al. Clinical laboratory evaluation of the Abbott MS-2 automated antimicrobial susceptibility testing system: report of a collaborative study. *J Clin Microbiol* 1980;12:375-90.
7. Kanemitsu K, Kunishima H, Inden K, Hatta M, Harigae H, Ishizawa K, et al. Evaluation of the BD Phoenix SMIC/ID, a new streptococci identification and antimicrobial susceptibility panel, for potential routine use in a university-based clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;53:101-5.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards: development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters. Approved guideline-second edition. Document M23-A2. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2001.
9. Food and Drug Administration, 5 March 2007. Class II Special controls guidance document: antimicrobial susceptibility test (AST) systems; guidance for industry FDA. Rockville: Food and Drug Administration, 2007.
10. Richter SS, Howard WJ, Weinstein MP, Bruckner DA, Hindler, Sa-bouille JM, et al. Multicenter evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system for antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus species*. *J Clin Microbiol* 2007;45: 2863-71.
11. Hiramata Y, Matsuda J, Nakano M, Hayashi T, Tokaza S, Takezawa T, et al. Evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system SMIC/ID panel for identification and antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;53:169-73.