

Originales

José Luis Gómez-Garcés*,
Fátima López-Fabal,
Almudena Burillo,
Yolanda Gil

Estudio comparativo de *Wider*, E-test y microdilución para la determinación de la sensibilidad a daptomicina y otros tres antimicrobianos de aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina y *Enterococcus* spp.

Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario de
Móstoles, Madrid

RESUMEN

Los costes humanos y materiales del tratamiento antimicrobiano inadecuado son altos. El objetivo de este trabajo es valorar métodos de determinación de la sensibilidad antimicrobiana rápidos, sencillos y eficientes que permitan identificar la mejor opción terapéutica en el caso de infecciones hospitalarias producidas por microorganismos resistentes o con sensibilidad disminuida frente a antibióticos tradicionales. Los métodos comparados han sido el gradiente de difusión (E-test), un método automatizado (*Wider*) y la microdilución, este último considerado de referencia, para vancomicina, teicoplanina, linezolid y daptomicina frente a aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM), *Staphylococcus coagulasa* negativo resistentes a meticilina (SCNRM) y *Enterococcus* spp. Tanto E-test como *Wider* resultan métodos fiables para su uso en la rutina microbiológica a la hora de categorizar la sensibilidad de estafilococos y enterococos frente a vancomicina, teicoplanina, linezolid y daptomicina. Solamente en aquellos casos de infecciones graves por enterococos, que requieran la determinación de la CMI de daptomicina con exactitud, es recomendable emplear un técnica de referencia como es la microdilución.

Palabras clave: sensibilidad, estándar, reproducibilidad, staphylococci, enterococci

Comparative study of the susceptibility to daptomycin and other antimicrobials against *Staphylococcus* spp. resistant to methicillin and *Enterococcus* spp. using *Wider*, E-test, and microdilution methods

Correspondencia:
Servicio de Microbiología Clínica. Hospital
Universitario de Móstoles. c/ Río Júcar s/n.
Móstoles 28935, Madrid.
Teléfono: (+34)-91-6648750
E-mail: jlgarces@microb.net

ABSTRACT

The human and material costs of inappropriate antimicrobial therapy are high. This study was designed to search for a rapid, simple and effective antimicrobial susceptibility test capable of identifying the best treatment strategy against microorganisms causing hospital infections showing resistance or reduced susceptibility to the more traditional antibiotics. The tests compared were the E-test, an automated test (*Wider*) and broth microdilution (as the reference test), to determine the susceptibility to vancomycin, teicoplanin, linezolid and daptomycin of clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), methicillin resistant coagulase negative *Staphylococcus* spp. and *Enterococcus* spp. The E-test and *Wider* methods showed good agreement with the reference method indicating their reliability for routine susceptibility testing of staphylococci and enterococci against vancomycin, teicoplanin, linezolid and daptomycin. Notwithstanding, when faced with a serious enterococcal infection, the MIC of daptomycin should be more accurately determined using a reference technique such as broth microdilution.

Key words: Microbial sensitivity tests/instrumentation/standards, reference standards, reproducibility of results, staphylococci, enterococci

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos entre las bacterias grampositivas constituye un grave problema que continúa agudizándose en los últimos años¹⁻⁴. La aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, tanto en el ámbito hospitalario como recientemente en el comunitario, representa un auténtico reto para el tratamiento de las infecciones causadas por este patógeno, comportando, además, una considerable carga económica^{4, 5}. De forma similar, un porcentaje elevado de estafilococos coagulasa negativo, aislados en ocasiones de muestras clínicas relevantes, como hemocultivos, líquidos articulares y prótesis u otros dispositivos endovasculares, se comportan como resistentes a antibióticos betalactámicos y a otros pertenecientes a otros

grupos de antimicrobianos². Por último, la aparición de cepas de *Enterococcus* spp. resistentes o con sensibilidad disminuida a glicopéptidos completan este inquietante panorama^{3,6}.

La escasa actividad de algunos antibióticos tradicionales frente a estos microorganismos con perfiles de resistencia más acusados, conlleva la necesidad de disponer de otros nuevos, y optimizar su empleo, mejorando el conocimiento de los mismos, especialmente en cuanto a las dosis prescritas y a la duración de los tratamientos.

La determinación de la sensibilidad *in vitro* de estos microorganismos frente a agentes potencialmente eficaces es de especial importancia para su correcta administración. Desgraciadamente, las técnicas disponibles no siempre ofrecen resultados superponibles y/o reproducibles por lo que la elección de la herramienta adecuada es un condicionante de primer orden para su determinación⁷⁻¹⁰. Aunque el tipo de técnica a emplear suele estar definido por comités o grupos de referencia, en ocasiones, técnicas alternativas más económicas o menos laboriosas pueden ofrecer variantes ventajosas, siempre que sus resultados sean fiables y concordantes con las técnicas de referencia.

El objetivo de este trabajo es el de comparar tres métodos de determinación de sensibilidad: un método automatizado (*Wider*), el gradiente de difusión (E-test) y la microdilución, este último considerado de referencia, para vancomicina, teicoplanina, linezolid y daptomicina frente a aislamientos clínicos de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM), *Staphylococcus* coagulasa negativo resistentes a meticilina (SCNRM) y *Enterococcus* spp., con el fin de poder establecer conclusiones para su incorporación en la rutina del laboratorio de microbiología.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos

Los microorganismos incluidos en el estudio procedían de muestras clínicas de pacientes estudiados en tres hospitales del área sur de la Comunidad de Madrid y fueron seleccionados bien por su resistencia a meticilina en el caso de *Staphylococcus* spp. o por presentar una sensibilidad disminuida o resistencia a glicopéptidos (CMI ≥ 2 mg/L) en el caso de *Enterococcus* spp., según la rutina empleada en cada laboratorio.

En conjunto se seleccionaron 60 SARM, 60 SCNRM y 60 enterococos aislados a lo largo del año 2007 e identificados siguiendo procedimientos habituales.

Como controles de calidad se emplearon las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos se obtuvieron a partir de sustancia valorada de potencia conocida suministrada por cada fabricante: vancomicina (Sigma-Aldrich, Madrid), teicoplanina (Sigma-Aldrich), linezolid (Pfizer, Ann Arbor, MI, USA) y daptomicina (Novartis Pharma AG, Basel, Suiza).

Pruebas de sensibilidad

Se utilizó como método de referencia el de microdilución, siguiendo las recomendaciones del CLSI¹¹. En el caso de daptomicina, se enriqueció el medio de cultivo con cationes de calcio hasta una concentración final de 50 mg/L¹¹. Brevemente, una microplaca de 96 pocillos con concentraciones crecientes de cada antimicrobiano se inocula con una suspensión del microorganismo a estudiar. El inóculo bacteriano se preparó a partir de una concentración 0,5 de la escala de McFarland en solución salina. El inóculo final se ajustó tras dilución en caldo Muller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) para obtener una concentración final aproximada de 5×10^5 unidades formadoras de colonias en cada pocillo. Tras 24 horas de incubación a 35°C, se consideró como la concentración mínima inhibitoria (CMI) la menor concentración del antimicrobiano que inhibe un crecimiento visible.

Determinación de la CMI por el método de gradiente de difusión (E-test)

Utilizando torundas de algodón, el inóculo de una suspensión 0,5 McFarland de cada microorganismo se extendió sobre una placa de agar Müller-Hinton hasta cubrir la superficie completa de la misma. Las tiras de E-test se colocaron en la placa en posición radial, incubándose en atmósfera de aire a 37°C durante 18 horas. En los casos en los que había sombras ó crecimiento de colonias pequeñas en el punto de corte, se consideró como CMI la inmediatamente superior según la interpretación acorde con las indicaciones del fabricante (bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Determinación de la CMI mediante un sistema automatizado de microdilución (*Wider*)

Se emplearon paneles *Wider* MIC/ID Gram Pos-2 (Francisco Soria Melguizo, Madrid), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los paneles contenían pocillos con los siguientes antimicrobianos y rangos de concentración: vancomicina 1-16 mg/L, teicoplanina 2-16 mg/L, linezolid 1-4 mg/L, daptomicina 0,5-4 mg/L. Otros resultados para otros antimicrobianos no fueron tenidos en cuenta en este estudio. Los paneles se inocularon usando el sistema de inoculación Prompt-D y posteriormente se sellaron, procediéndose a su lectura tras la incubación pertinente. El sistema determina automáticamente la identificación y la CMI correspondientes a cada antimicrobiano, que se confirmó tras la lectura visual de los paneles.

Interpretación y análisis de los resultados

Los aislamientos se categorizaron como sensibles, intermedios o resistentes siguiendo los criterios propuestos por el CLSI para cada antimicrobiano y cada microorganismo¹¹. Los resultados discordantes fueron reevaluados al menos en dos ocasiones. Los criterios utilizados fueron los siguientes: "concordancia", cuando la CMI obtenidas con el método en estudio y el de referencia fueron idénticas o variaban en ± 1

\log_2 ; "error muy grave", cuando la CMI obtenida por el método en estudio clasificaba al microorganismo como sensible y la obtenida por el método de referencia como resistente; "error grave", cuando la CMI obtenida por el método en estudio clasificaba al microorganismo como resistente y la obtenida por el método de referencia como sensible; "error menor", cuando la CMI obtenida por el método en estudio clasificaba al microorganismo como intermedio y el método de referencia como sensible o resistente, y viceversa.

RESULTADOS

Todos los aislamientos fueron estudiados mediante los métodos descritos, y los resultados se compararon con los obtenidos con el de microdilución, considerado como método de referencia. La CMI de las cepas control estuvo dentro de los rangos establecidos. La tabla 1 muestra el intervalo, la CMI₅₀, la CMI₉₀ y los porcentajes de sensibilidad de cada grupo de microorganismos a los cuatro antimicrobianos probados utilizando el método de referencia. Todos las cepas de *Staphylococcus* spp. se consideraron sensibles frente a los cuatro antimicrobianos estudiados. Por el contrario entre las 60 cepas de *Enterococcus* spp., el 75,4% fueron resistentes a vancomicina y el 16,2% a teicoplanina. Además cuatro de ellas (5%) se consideraron intermedias a linezolid. Todas las cepas fueron sensibles a daptomicina. Las tablas 2 y 3 reflejan los resultados de los otros métodos estudiados cuando se comparan con los obtenidos con el de microdilución, método de referencia.

Comparación de *Wider* y microdilución

La comparación de *Wider* con la microdilución muestra un elevada concordancia para todos los microorganismos con todos los antimicrobianos, cercana al 100% en todos los casos con excepción hecha de las cepas de *Enterococcus* spp. y daptomicina para las que se alcanza un porcentaje del 89,4 % de concordancia. Un error muy grave ocurrió con una cepa de *Enterococcus faecalis* y teicoplanina. Hubo un error grave con una cepa de *Staphylococcus epidermidis* y linezolid. Los enterococos presentaron el mayor acúmulo de errores menores: 3,5% para vancomicina y teicoplanina, y 12,3% para linezolid. Este tipo de errores se dieron en el 5,1% de los SCN para teicoplanina.

Comparación entre E-test y microdilución

Comparando el gradiente de difusión con la técnica de referencia se observa una correlación excelente para todos los estafilococos con todos los antimicrobianos probados, oscilando desde el 100% para vancomicina entre los SCN, hasta el 83,1% en este mismo grupo de microorganismos y linezolid.

En conjunto, no hubo errores muy graves o graves, y entre los menores destacaban los referentes a vancomicina con un 14% para las cepas de *Enterococcus* spp., un 5,1% entre los SCN y un 3,3% entre los *S. aureus*. Además se detectaron un 10,5% de estos errores menores para linezolid al probar el conjunto de *Enterococcus* spp. y un 3,4% para teicoplanina en los SCN. Sin embargo, los porcentajes de concordancia entre

estos microorganismos y daptomicina solamente fue del 57,9%. No obstante este alto índice de desacuerdo no se tradujo en ningún caso en errores muy graves, graves o menores para este grupo de microorganismos y este antibiótico.

DISCUSIÓN

La presencia de bacterias grampositivas con mecanismos de resistencia adquiridos resulta en estos momentos una constante en la rutina del laboratorio de microbiología. La aparición y diseminación de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina y, en consecuencia, la inutilización de todos los antibióticos betalactámicos para el tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos constituye un importante problema de salud pública que continúa preocupando a la comunidad científica. Por otro lado el incremento de infecciones enterocócicas debidas a cepas con sensibilidad disminuida a los glicopéptidos es, de igual forma, un acontecimiento frecuente que alerta ante la posibilidad de la extensión de estas cepas, dificultando, en ocasiones, los tratamientos seguidos con estos antibióticos. En este sentido, y aunque el CLSI¹¹ establece como puntos de corte para categorizar una cepa de *Enterococcus* spp. como resistente a vancomicina una CMI ≥ 32 mg/L, considerando sensibles aquellas con CMI ≤ 4 mg/L, es recomendable disponer de otras posibilidades terapéuticas.

Aunque el propósito de este trabajo no era la valoración de la sensibilidad de los microorganismos frente a distintos antimicrobianos, entre otras razones porque partíamos de cepas elegidas previamente en razón a su comportamiento frente a los mismos, debemos señalar que entre ellos, y tomando como criterios interpretativos los del CLSI, todas las cepas de SARM y todas menos una de los SCNRM seleccionados eran sensibles a los cuatro antimicrobianos estudiados. Solo una cepa de *S. epidermidis* presentaba una CMI de 16 mg/L frente a teicoplanina, inhibiéndose el resto con 2 mg/L de vancomicina y teicoplanina para los SARM y 4 mg/L y 8 mg/L, respectivamente, para los SCNRM. La CMI de linezolid y daptomicina fue para todos ellos ≤ 4 mg/L y ≤ 1 mg/L respectivamente (tabla 1).

Entre los *Enterococcus* spp. seleccionados por su sensibilidad disminuida a vancomicina, tres cuartas partes (75,4%) eran resistentes a la misma con CMI ≥ 64 mg/L, un 16,2% eran resistentes a teicoplanina, todas las cepas menos una fueron sensibles a linezolid y todas eran sensibles a daptomicina (tabla 1).

A partir de estos datos, la concordancia del sistema *Wider* con el método de referencia fue muy buena para todos los microorganismos estudiados, siendo prácticamente superior al 90% para los cuatro antimicrobianos probados. Con el E-test los resultados de concordancia obtenidos fueron igualmente excelentes para estafilococos y los cuatro antimicrobianos, disminuyendo, sin embargo, esta concordancia al valorar los resultados de daptomicina entre los enterococos. La conocida

Tabla 1	Intervalo, CMI ₅₀ (mg/L), CMI ₉₀ (mg/L) y porcentajes (%) de sensibilidad de las cepas estudiadas mediante microdilución					
	Intervalo	CMI ₅₀	CMI ₉₀	S	I	R
	SARM ^a (n=60)					
Vancomicina	0,5-2	1	2	100	-	-
Teicoplanina	0,5-2	1	2	100	-	-
Linezolid	0,25-4	2	4	100	-	-
Daptomicina	0,25-1	0,5	1	100	-	-
	SCNRM ^b (n=60)					
Vancomicina	0,5-4	2	4	100	-	-
Teicoplanina	0,5-16	2	8	98,3	1,7	-
Linezolid	1-4	1	2	100	-	-
Daptomicina	0,25-1	1	1	100	-	-
	<i>Enterococcus</i> spp. (n=60)					
Vancomicina	2-≥64	≥64	≥64	10,5	14	75,4
Teicoplanina	0,5-≥64	1	32	82,6	1,2	16,2
Linezolid	0,5-4	2	2	95	5	-
Daptomicina	0,5-4	2	4	100	-	-

n número de cepas estudiado; S: sensible, I: intermedio, R: resistente.

^a SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; ^bSCNRM: *Staphylococcus coagulasa* negativo resistentes a meticilina.

Tabla 2	Concordancia, errores muy graves, graves y menores entre el método de referencia y otros métodos alternativos (Wider y E-Test) para las cepas estudiadas								
	Microorganismo	Porcentaje de concordancia (%)		Porcentaje de errores muy graves (%)		Porcentaje de errores graves (%)		Porcentaje de errores menores (%)	
		Wider	E-test	Wider	E-test	Wider	E-test	Wider	E-test
	SARM ^a (n=60)								
Vancomicina	98,3	93,3	-	-	-	-	-	-	3,3
Teicoplanina	100	93,3	-	-	-	-	-	-	-
Linezolid	96,7	90	-	-	-	-	-	-	-
Daptomicina	100	98,3	-	-	-	-	-	-	-
	SCNRM ^b (n=60)								
Vancomicina	98,3	100	-	-	-	-	-	-	5,1
Teicoplanina	89,8	93,2	-	-	-	-	5,1	-	3,4
Linezolid	98,3	83,1	-	-	1,7	-	-	-	-
Daptomicina	100	94,8	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Enterococcus</i> spp. (n=60)								
Vancomicina	96,5	96,5	-	-	-	-	3,5	-	14
Teicoplanina	96,5	96,5	1,8	-	-	-	3,5	-	-
Linezolid	100	98,2	-	-	-	-	12,3	-	10,5
Daptomicina	89,4	57,9	-	-	-	-	-	-	-

n número de cepas estudiado.

^a SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; ^bSCNRM: *Staphylococcus coagulasa* negativo resistentes a meticilina

Tabla 3

Diferencias en los valores de CMI de vancomicina, teicoplanina, linezolid y daptomicina obtenidos por E-test y *Wider* comparados con la microdilución

E-test	Valores de CMI comparados (%)				
	-2 diluciones	-1 dilución	0	+1 dilución	+2 diluciones
SARM^a					
Vancomicina	0	0	40	53,3	6,7
Teicoplanina	0	3,3	20	70	6,7
Linezolid	8,4	31,7	53,3	5	1,7
Daptomicina	0	28,3	46,7	23,3	1,7
SCNRM^b					
Vancomicina	0	10,2	71,2	18,6	0
Teicoplanina	1,7	22	40,7	30,5	5,1
Linezolid	15,3	32,2	50,8	0	1,7
Daptomicina	3,4	16,9	54,2	23,7	1,7
<i>Enterococcus</i> spp.					
Vancomicina	3,5	5,3	86	5,3	0
Teicoplanina	0	5,3	47,4	43,9	3,5
Linezolid	0	7	80,7	10,5	1,8
Daptomicina	0	1,8	19,3	36,8	42,1
<i>Wider</i>	Valores de CMI comparados (%)				
	-2 diluciones	-1 dilución	0	+1 dilución	+2 diluciones
SARM^a					
Vancomicina	0	20	58,3	20	1,7
Teicoplanina	0	0	100	0	0
Linezolid	0	13,3	75	8,3	3,4
Daptomicina	0	10	76,7	13,3	0
SCNRM^b					
Vancomicina	1,7	18,6	69,5	10,2	0
Teicoplanina	10,2	28,8	54,2	6,8	0
Linezolid	0	22	61	15,3	1,7
Daptomicina	0	3,4	96,6	0	0
<i>Enterococcus</i> spp.					
Vancomicina	3,5	0	86	10,5	0
Teicoplanina	1,8	3,5	91,2	1,8	1,8
Linezolid	0	26,3	63,2	10,5	0
Daptomicina	0	19,3	33,3	36,8	10,5

^a SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; ^bSCNRM: *Staphylococcus coagulasa* negativo resistentes a meticilina

dificultad en la difusión en agar de esta molécula podría explicar las discordancias observadas en estos casos, aunque en ningún caso se consideraran errores graves o muy graves (tabla 2).

En general, en la mayoría de los casos, la CMI determinada por los sistemas alternativos se correspondía con diluciones más altas que las obtenidas por el método de referencia (tabla 3), de forma similar a lo reseñado por otros autores⁹.

Los errores significativos de todo el estudio se redujeron exclusivamente a un error muy grave y otro grave, el primero con una cepa de *Enterococcus faecium* cuya CMI de

teicoplanina mediante *Wider* fue 4 mg/L, mientras que con el método de referencia fue ≥ 64 mg/L, y el segundo con una cepa de *Staphylococcus epidermidis* considerada como resistente a linezolid por el sistema automatizado con una CMI de este antimicrobiano de 32 mg/L, mientras que la microdilución consideraba una CMI de 2 mg/l para el mismo.

Entre los errores leves, que fueron más numerosos, destacan los referentes a linezolid entre las cepas de enterococos, tanto por uno como por otro de los métodos estudiados.

Podemos concluir que, en conjunto, tanto E-test como *Wider* resultan métodos fiables para su uso en la rutina microbiológica a la hora de categorizar la sensibilidad de estafilococos y enterococos aislados de muestras clínicas. No obstante, la valoración exacta de la CMI de daptomicina por ambos sistemas presentan frecuentes discordancias para *Enterococcus* spp., producto verosímilmente de la necesidad de ajuste de los cationes de calcio en los pocillos o en el medio de soporte utilizado cuando se estudia este antimicrobiano frente a estos microorganismos y de la dificultad inherente al mismo para difundir con facilidad en medios con agar, por lo que, en caso de infecciones graves por estos microorganismos y en los que se quiera conocer con una mayor exactitud la CMI correspondiente, parece conveniente un segundo acercamiento mediante una técnica de referencia como microdilución.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Aksoy DY, Unal S. New antimicrobial agents for the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:411-20.
- 2.- Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MJ, Vindel A, Trincado P, Boquete T et al. *Staphylococcus* spp. in Spain: present situation and evolution of antimicrobial resistance (1986-2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26:269-77.
- 3.- Ergani-Ozcan A, Naas T, Baysan BO, Ogunc D, Inan D, Colak D et al. Nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric unit at a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1033-39.
- 4.- Goetghebeur M, Landry PA, Han D, Vicente C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A public health issue with economic consequences. *The Can J Infect Dis Med Microbiol* 2007;1827-34.
- 5.- Shorr AF, Micek ST, Kollef MH. Inappropriate therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: resource utilization and cost implications. *Crit Care Med* 2008;36:2335-40.
- 6.- Oprea SF, Zaidi N, Donabedian SM, Balasubramaniam M, Hershberger E, Zervos MJ. Molecular and clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:626-30.
- 7.- Canton R, Perez-Vazquez M, Oliver A, Sanchez Del Saz B, Gutierrez MO, Martinez-Ferrer M et al. Evaluation of the *Wider* system, a new computer-assisted image-processing device for bacterial identification and susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 2000;38:1339-46.
- 8.- Garcia-Garrote F, Cercenado E, Bouza E. Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. *J Clin Microbiol* 2000;38:2108-11.
- 9.- Jorgensen JH, Crawford SA. Assessment of two commercial susceptibility test methods for determination of daptomycin MICs. *J Clin Microbiol* 2006;44:2126-29.
- 10.- Muller-Serieys C, Drugeon HB, Etienne J, Lascols C, Leclercq R, Nguyen J et al. Activity of linezolid against Gram-positive cocci isolated in French hospitals as determined by three in-vitro susceptibility testing methods. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:242-6.
- 11.- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Seventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7* [ISBN 1-56238-587-9]. Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400 2006.