

Rocío Tejero
Manuel Causse
M^a Araceli Moreno
Francisco Solís
Fernando Rodríguez-López
Manuel Casal

Evaluación de la variabilidad en la sensibilidad de *Acinetobacter baumannii* a tigeciclina en un mismo medio de cultivo con dos métodos de difusión cuantitativos comerciales diferentes

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba.

RESUMEN

Introducción: Tigeciclina puede suponer una alternativa terapéutica para el control de *Acinetobacter baumannii* multirresistente, si bien no existe consenso en cuanto a los puntos de corte de sensibilidad ni a la variabilidad de su concentración mínima inhibitoria (CMI) en función del medio de cultivo y tiras para realizar el antibiograma frente a este microorganismo por el método de difusión cuantitativa. Por ello, el objetivo ha sido verificar dicha variabilidad, así como proponer la tira de epsilometer test que más se aproxime al método estándar.

Material y métodos: Se seleccionaron 38 cepas de *A. baumannii*. Se analizó su sensibilidad frente a tigeciclina con dos tiras comerciales diferentes (E-TEST y Liofilchem). Las CMI se compararon con las obtenidas mediante la técnica estándar de microdilución en caldo.

Resultados: Las CMI obtenidas con la tira Liofilchem fueron las que más similitud tuvieron frente al método estándar.

Conclusiones: En las dos tiras estudiadas, se observan CMI superiores al estándar, lo que supone interpretar falsas resistencias en muchos casos. No obstante, la tira que se aproxima más al de referencia es la de Liofilchem.

Palabras clave: Tigeciclina, *Acinetobacter baumannii*, CMI, método de difusión cuantitativa, sensibilidad

Evaluation of the variability in the susceptibility of *Acinetobacter baumannii* to tigecycline in the same medium with two methods of quantitative diffusion different commercial

ABSTRACT

Introduction: Tigecycline may be a therapeutic alternative for the control of multidrug-resistant *Acinetobacter*

baumannii, although there is no consensus on the cutoffs or susceptibility to the variability of the minimum inhibitory concentration (MIC) according to the culture medium and strips for the antibiogram against this microorganism by quantitative diffusion method. Therefore, the objective was to verify this variability and propose epsilometer test strip that more closely resemble to the standard method.

Material and methods: 38 strains of *A. baumannii* were selected and evaluated their susceptibility to tigecycline with two different commercial strips (E-TEST and Liofilchem). MICs were compared with those obtained by the standard technique of microdilution broth.

Results: MICs obtained by the Liofilchem strip were more similar to standard method than those obtained by E-TEST strips.

Conclusion: In the two studied strips, higher MICs to those obtained by the standard method were observed leading to false-positive tigecycline resistance in many cases. However, the Liofilchem strip showed the results more closely resemble to the standard method.

Keywords: Tigecycline, *Acinetobacter baumannii*, CMI, quantitative diffusion method, susceptibility

INTRODUCCIÓN

El aumento mundial y gradual de la resistencia a antimicrobianos está amenazando la capacidad de tratar eficazmente a los pacientes. Los patógenos resistentes están aumentando de forma alarmante sobre todo en el área hospitalaria, mientras que las opciones terapéuticas están disminuyendo¹. *Acinetobacter baumannii* está considerado como uno de los principales microorganismos relacionado con la infección nosocomial, afecta fundamentalmente a pacientes con enfermedades subyacentes graves, sometidos a cirugía, distintos tipos de manipulaciones, procedimientos invasivos, uso previo de antibióticos de amplio espectro e ingresos hospitalarios prolongados, incluyendo estancia en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI)/Reanimación². Es un cocobacilo gramnegativo, aerobio estricto, no fermentador, catalasa positivo, oxidasa negativo e inmóvil. Posee pocos determinantes de patogenicidad pero se

Correspondencia:
Dra. Rocío Tejero García
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Reina Sofía.
Avda. Menéndez Pidal S/N.
14004. Córdoba. España.
Teléfono y fax: +34 957 01 04 32
E-mail: rociotejero@hotmail.com

comporta con virulencia en situaciones en las que el paciente se encuentra sometido a intervenciones médicas invasivas. En estos pacientes es responsable de una elevada mortalidad asociada fundamentalmente en casos de neumonía en pacientes con ventilación mecánica y en casos de bacteriemias por este microorganismo³. Otras infecciones relacionadas con *A. baumannii* son las de piel y tejidos blandos, urinarias, endocarditis y meningitis⁴. El principal problema de este microorganismo radica en la gran capacidad de adquirir resistencias, existiendo cepas en las que a veces no se encuentra sensibilidad a ningún antibiótico habitualmente utilizado para gramnegativos^{2,5,6}. Por ello cualquier nuevo antibiótico debe ser testado frente a este microorganismo, uno de los más resistentes en infecciones nosocomiales. Su multiresistencia es aprovechada por *A. baumannii* para colonizar e infectar a pacientes sometidos a gran presión antibiótica, como son los enfermos de UCI. Otro factor que ayuda a su expansión en estas unidades es su capacidad para sobrevivir durante largos períodos en el medio ambiente⁶. El concepto de multiresistencia se define como la resistencia a más de dos de los siguientes grupos de antibióticos: cefalosporinas antipseudomónicas (cefepime, ceftazidima), carbapenemes antipseudomónicos (meropenem, imipenem), fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina) o sulbactam². Por ello, se plantea la necesidad de la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que permitan mejorar el control sobre este microorganismo. Tigeciclina es el primero de una nueva clase de antibióticos (glicilglicinas) que actúa inhibiendo la síntesis proteica, presentando actividad bacteriostática. Tiene una excelente actividad frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), bacilos gramnegativos productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y *A. baumannii* multiresistente^{1,4}. Se usa para el tratamiento de infecciones complicadas de piel y tejidos blandos e infecciones intraabdominales complicadas^{5,7} y se ha utilizado en el tratamiento de infecciones respiratorias bacterianas debido a su amplio espectro de acción y a su buena perfusión en el tejido pulmonar, por ello está siendo evaluado para el tratamiento de neumonías hospitalarias y comunitarias^{5,8-10}. Numerosos estudios han obtenido resultados prometedores utilizando tigeciclina para el tratamiento de las infecciones invasivas por *A. baumannii* en UCIs, sin embargo otros más recientes han publicado altos índices de resistencias entre sus cepas^{3,11-13}. El objetivo propuesto ha sido verificar la variabilidad de la CMI de tigeciclina frente a *A. baumannii* utilizando dos tiras para métodos de difusión cuantitativos diferentes, E-test de bioMérieux (T1) y Liofilchem de IZASA (T2) sobre un mismo medio de cultivo convencional, respecto al método de referencia (ME) de microdilución en caldo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han seleccionado 38 cepas multiresistentes de *A. baumannii*, una por paciente, recogidas aleatoriamente de muestras del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, durante los años 2008-2010.

Muestras: La procedencia de las muestras era: 36 (94,7%) intrahospitalarias, de las que provenían de UCI 26 (68,4%), de Medicina Interna y Neumología 3 (7,9%) respectivamente, de Pediatría, Nefrología, Cirugía general y Neurología 1 (2,6%) respectivamente y 2 (5,3%), extrahospitalarias.

Las muestras se distribuyeron en: sangre 12 (31,6%), BAS 9 (23,7%) esputo 7 (18,4%), exudado purulento 4 (10,5%), catéter y exudado faríngeo 2 (5,3%) respectivamente y líquido pleural y exudado nasofaríngeo 1 (2,6%), respectivamente.

Procesamiento: El cultivo de la muestra se realizó siguiendo el protocolo y el procedimiento habitual del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba. La identificación así como el perfil de sensibilidad a diferentes antibióticos se realizó por el método semiautomatizado Wider I® (Paneles CO95-31/W/REV1). Todas estas cepas fueron consideradas como multiresistentes al detectarse CMI's consideradas mayores que el punto de corte para: piperacilina-tazobactam, ceftazidima, gentamicina, amikacina, ciprofloxacino. Fueron sensibles a colistina 37 (97,4%) de las cepas, ampicilina-sulbactam 18 (47,4%), minociclina 14 (24%), tobramicina 10 (26,3%) e imipenem y meropenem 7 (18,4%) de las cepas respectivamente. Posteriormente para la ampliación del antibiograma se analizó la sensibilidad frente a tigeciclina por el método de difusión cuantitativo. Se preparó el inóculo a partir de colonias aisladas de 24 horas de cultivo a 0,5 Mc Farland en suero fisiológico en una placa de Mueller-Hinton de la casa comercial bioMérieux® (Marcy l'Étoile, France), bañada con un escobillón, colocando a continuación en la misma placa las dos tiras de tigeciclina de las dos marcas comerciales, E-test (T1) y tira de Liofilchem (T2) (figura 1), dejando incubar 24 horas a 37°C en aerobiosis. Se procedió a la lectura de la CMI al 100% de inhibición del crecimiento. En cada serie de test se incluyó *Escherichia coli* ATCC 25922 como cepa control para asegurar el correcto proceder de la prueba. Para realizar el método estándar (ME) a todas las cepas se les efectuó la determinación de la CMI de tigeciclina mediante microdilución en caldo de Sensititre®, utilizando agua desmineralizada y los paneles preparados para testar sensibilidad a gramnegativos (CMP11HM). El CLSI no aporta puntos de corte para tigeciclina en *A. baumannii*¹⁴ por lo que en numerosos estudios se aplican los criterios que Tygacil® posee en la FDA para enterobacterias, aunque sin duda son muy elevados para esta bacteria, considerando sensible cuando es ≤ 2 mg/L, intermedio cuando se sitúa entre 3 y 6 mg/L y resistente cuando es ≥ 8 mg/L. Se consideró un error menor cuando una cepa sensible o resistente se interpreta como intermedia, un error grave cuando una sensible aparece como resistente y un error muy grave cuando se arroja un resultado falso de sensibilidad. La concordancia de resultados fue estudiada en categorías: sensible, intermedia y resistente midiendo el porcentaje entre categorías de los distintos test. Los datos fueron analizados en el programa SPSS versión 12.0.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la serie de 38 cepas de *A. baumannii* por CMI de tigeciclina del ME fueron: 35 (92,11%) cepas sensibles; siendo 2 (5,26%) intermedias y 1 (2,63%)

	CMI* (mg/L)														
	≤0,008-0,06	0,12	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2	3	4	6	8	12	24	48
ME*	0	1	1	10	0	20	0	3	0	2	0	1	0	0	0
T1*	0	0	0	0	2	0	1	2	10	8	7	3	1	3	1
T2*	0	2	0	4	7	7	12	2	0	0	3	0	1	0	0

*CMI: Concentración mínima inhibitoria. ; * T1:E-TEST, T2: LIOFILCHEM y ME: MÉTODO ESTÁNDAR

	T1*	T2*	ME*
Media ± DS	7,03±8,96	1,75±2,22	1,25±1,39
Mediana	4	1	1
Moda	3	1,5	1
Mínimo	0,75	0,12	0,12
Máximo	48	12	8
Sensible (%)	5	34	35
Intermedio (%)	25	3	2
Resistente (%)	8	1	1
CMI ₅₀	4	1	1
CMI ₉₀	24	6	2,20

* T1:E-TEST; T2: LIOFILCHEM; ME: MÉTODO ESTÁNDAR

resistente. La CMIs más frecuentes fueron de 1 mg/L con 20 (52,63%) cepas; 0,5 mg/L con 10 (26,32%) cepas; 2 mg/L con 3 (7,89%) cepas. Los resultados con la tira T1: 5 (13,16%) de las cepas fueron sensibles, 25 (65,79%) intermedias y 8 (21,05%) resistentes. Las CMIs más frecuentes por la tira T1, fueron de 3 mg/L con 10 (26,32%) cepas; 4 mg/L con 8 (21,05%) cepas; 6 mg/L con 7 (18,42%) cepas. Con la tira T2, 34 (89,48%) de las cepas fueron sensibles, 3 (7,89%) intermedias y 1 (2,63%). La CMIs más frecuentes por tira T2, fueron de 1,5 mg/L con 12 (31,58%) cepas; 0,75 mg/L y 1 mg/L con 7 (8,42%) cepas respectivamente; 0,5 mg/L con 4 (10,53%) cepas. Estos resultados están reflejados en las tablas 1 y 2. Con la tira T1 se obtienen peores resultados de sensibilidad respecto al ME ya que, se obtienen sólo 5 cepas sensibles respecto a las 35 cepas sensibles por ME, 23 cepas falsamente intermedias y 7 cepas falsamente resistentes que serían sensibles. La tira T2, coincide con el ME en sensibilidad en 34 cepas y en la cepa resistente y una cepa falsamente intermedia. Se observa en la tabla 2, que la CMI₉₀ varía mucho dependiendo de la tira respecto al método estándar, mientras que en la CMI₅₀ coincide el método estándar con la tira T2. El acuerdo y el número de errores máximos, mayores

y menores entre las tiras y el ME de referencia se encuentra en la tabla 3.

DISCUSIÓN

La implantación de microorganismos multirresistentes como *A. baumannii* en muchos hospitales españoles, representa un serio problema que puede tener una influencia muy importante en la correcta elección del tratamiento antibiótico¹. Ante la creciente amenaza de resistencia antimicrobiana y la evidencia de que la terapia inadecuada inicial puede conducir al fracaso terapéutico y al aumento de la mortalidad además de a un aumento de la carga sanitaria, existe una clara necesidad de nuevos agentes antimicrobianos de amplio espectro^{1,2}. Además la prevalencia cada vez mayor de estos microorganismos multirresistentes en todo tipo de infecciones, puede condicionar modificaciones en el tratamiento antibiótico empírico inicial haciéndose necesario antibióticos, como tigeciclina, que sean capaces de cubrir estos microorganismos de forma precoz. La aparición de bacterias con resistencia a varios antibióticos está creando una situación en que algunas infecciones bacterianas graves apenas cuentan con opciones de tratamiento^{3,4,7}. Papel importante por parte de los laboratorios informar CMI correctas y consensuar puntos de corte de la sensibilidad de los nuevos antibióticos frente a los microorganismos. Aunque el método de difusión cuantitativo es válido para obtener una CMI y una interpretación de la sensibilidad de una cepa a un determinado antibiótico, la aparición de nuevos fármacos y su incorporación casi inmediata a las tiras permite un testado rápido haciendo ver que existen ciertas deficiencias en la estandarización del método y que la composición del medio o las tiras debe ser óptima para que cada fármaco pueda actuar. Este fenómeno ya se ha observado con la daptomicina y la necesidad de calcio en el medio¹³ y parece relacionado en tigeciclina con el manganeso¹⁴⁻¹⁶. Algunos autores refieren este hecho, a la concentración de manganeso existente en el medio de cultivo, a mayor concentración mayor inactivación del antibiótico⁵ en el caso de la tigeciclina que en elevadas concentraciones en el medio eleva también la CMI. También se relaciona fechas de fabricación del medio sólido y de las tiras cercanas a la fecha de caducidad con elevadas CMIs, necesitando de un medio fresco¹⁷. Todos estos aspectos son importantes pudiendo rela-

Tabla 3 Acuerdo y número de errores en las CMI's respecto al ME.				
TIRAS (n=38)	Acuerdo esencial (%)	Errores máximos	Errores mayores	Errores menores
T1*	13,16	0	7	23
T2*	89,48	0	0	1

* T1: ETEST; T2: LIOFILCHEM

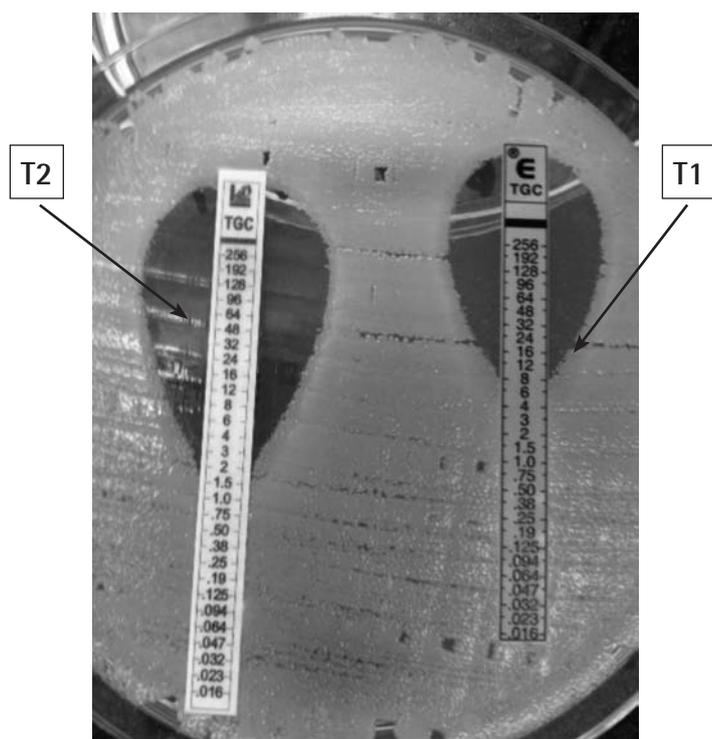


Figura 1 CMI's de la tira E-TEST y LIOFILCHEM

T1: E-TEST; T2: Liofilchem

cionarse con las gran variabilidad de resultados obtenidos a la hora de testar tigeciclina, sobre todo en cepas de *A. baumannii*. Sin embargo en laboratorios donde se utilizan los medios comercializados por el gran número de muestras es necesario encontrar el medio y la tira que tenga correlación adecuada con los resultados del método de referencia. De las dos tiras comerciales ensayadas solo la tira Liofilchem ofrece unos resultados óptimos comparados a los que obtiene el sistema validado por CLSI (microdilución), utilizando como medio de cultivo uno de los que arrojaban peores resultados en cuanto a la sensibilidad de la tigeciclina. En la revisión de la literatura 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's de tigeciclina mediante el método de difusión cuantitativa y microdilución en caldo como gold standard, en el cual refieren un alto porcentaje de falsas resistencias por el método difusión cuantitativa (93%)⁵. 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 estándar⁵. En conclusión, podemos apuntar que se ha confirmado una alta variabilidad de la CMI de tigeciclina frente a según la marca comercial de las tiras para difusión cuantitativa utilizadas, apareciendo un alto porcentaje de falsas resistencias con T1. Con los hallazgos obtenidos en la presente serie, podemos proponer el uso de T2 en la práctica clínica por su mejor correlación con el método estándar (figura 1). Aunque, en cualquier caso, serán necesarios otros estudios complementarios que relacionen los datos de CMI obtenidos con el éxito terapéutico.

FINANCIACIÓN

El trabajo no ha recibido ningún tipo de financiación.

BIBLIOGRAFÍA

1. García-Rodríguez JA y Grupo de Estudio de Sensibilidad Antibiótica. Estudio multicéntrico de la actividad in vitro de tigeciclina en aislados clínicos en 30 hospitales españoles. Rev Esp Quimioter 2009; 22:76-82.
2. Hernández Torres A, García Vázquez e, Yagüe G, Gómez Gómez J. multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. Rev Esp Quimioter 2010; 23:12-9.
3. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jimenez-Jimenez FJ, Barrero-Almodovar AE, Garcia-Garmendia JL, Bernabeu-Wittel IM, et al. Treatment of multidrug-resistant ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: A comparison with imipenem-susceptible VAP. Clin Infect Dis 2003; 36: 1111-8.

4. Peleg AY, Paterson DL. Multidrug-resistant *Acinetobacter*: A threat to the antibiotic era. *Intern Med J* 2006; 36: 479-82.
5. Tenorio- Abreu A, Eiros Bouza JM, Rodríguez- Molins E, Andaluz Ojeda D, Bobillo de Lamo F, Domínguez- Gil González M, et al. Variabilidad en la sensibilidad de tigeciclina frente a en diferentes medios de cultivo. *Rev Esp Quimioter* 2010; 23:76-80.
6. Maragakis LL, Perl TM. : Epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis*. 2008; 46: 1254-63.
7. Giménez MJ, García- Rey C, Barberán J, Aguilar L. Experiencia clínica con tigeciclina en el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por aislados con mecanismos de resistencia prevalentes. *Rev Esp Quimioter* 2009; 22:48-56.
8. Jawad A, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Exceptional desiccation tolerance of . *J Hosp Infect* 1998; 39:235-40.
9. Karageorgopoulos DE, Kelesidis T, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) infections: A review of the scientific evidence. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:45-55.
10. Poulakou G, Kontopidou FV, Paramythiotou E, Kompoti M, Katsiari M, Mainas E, et al. Tigecycline in the treatment of infections from multi-drug resistant gram-negative pathogens. *J Infect* 2009; 58:273-84.
11. Peleg AY, Adams J, Paterson DL. Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in . *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:2065-9.
12. Reid GE, Grim SA, Aldeza CA, Janda WM, Clark NM. Rapid development of resistance to tigecycline. *Pharmacotherapy* 2007; 27:1198-201.
13. Navon-Venezia S, Leavitt A, Carmeli Y. High tigecycline resistance in multidrug-resistant . *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:772-4.
14. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 2009.
15. Ho SW, Jung D, Calhoun JR, Lear JD, Okon M, Scott WR, et al. Effect of divalent cations on the structure of the antibiotic daptomycin. *Eur Biophys J* 2008; 37:421-33.
16. Fernandez-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; 47:827-9.
17. Hope R, Warner M, Mushtaq S, Ward ME, Parsons T, Livermore DM. Effect of medium type, age and aeration on the MICs of tigecycline and classical tetracyclines. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:1042-6.