

Nuria Sanz-Rodríguez<sup>1</sup>  
María Teresa Pérez-Pomata<sup>1</sup>  
Olha Stelmakh<sup>1</sup>  
David Pérez-Boto<sup>2</sup>  
José Luis Gómez-Garcés<sup>1</sup>

# Precisión del método E-test para el estudio de la sensibilidad de *Campylobacter* spp. a eritromicina, ciprofloxacino y tetraciclina

<sup>1</sup>Servicio de Microbiología. Hospital de Móstoles. Madrid.

<sup>2</sup>Laboratorio de *Campylobacter*, *Yersinia* y *Vibrio*, Sección de Enterobacterias, Servicio de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología (ISCIII). Majadahonda, Madrid.

## RESUMEN

**Introducción.** En los países industrializados el enteropatógeno bacteriano más frecuentemente aislado de las heces de pacientes con gastroenteritis es *Campylobacter jejuni*. Evaluamos la precisión del Etest para categorizar la susceptibilidad de *Campylobacter* spp. frente a eritromicina, ciprofloxacino y tetraciclina.

**Métodos.** Estudiamos 90 cepas. El Etest<sup>®</sup> se realizó en placas comerciales de Mueller Hinton con sangre siguiendo las instrucciones del fabricante. Los puntos de corte fueron los recomendados por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) para microdilución en caldo. El método de referencia fue el de microdilución en caldo descrito por el CLSI.

**Resultados.** La concordancia del Etest con el método de referencia fue 100%, 97% y 98% para eritromicina, ciprofloxacino y tetraciclina respectivamente. No hubo errores graves ni muy graves.

**Conclusiones.** Con Etest se obtienen resultados equivalentes a los del método de referencia por lo que es válido para categorizar las cepas clasificadas como no resistentes a eritromicina y ciprofloxacino mediante el método de difusión y determinar la susceptibilidad frente a tetraciclina.

**Palabras clave:** *Campylobacter*, susceptibilidad antimicrobiana, eritromicina, ciprofloxacino, tetraciclina, microdilución en caldo.

## Accuracy of Etest method to study *Campylobacter* spp. susceptibility to erythromycin, ciprofloxacin and tetracycline

## ABSTRACT

**Introduction.** In industrialized countries *Campylobacter*

*jejuni* is the enteropathogen most frequently isolated from the feces of patients with gastroenteritis. The Etest accuracy to categorize *Campylobacter* spp. susceptibility to erythromycin, ciprofloxacin and tetracycline was evaluated.

**Methods.** Ninety strains were studied. The Etest<sup>®</sup> was performed following the manufacturer's instructions on commercial plates of Mueller-Hinton blood. The breakpoints were those recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) for broth microdilution. The gold standard was the broth microdilution method as recommended by CLSI.

**Results.** The Etest agreement with the reference method was 100%, 97% and 98% for erythromycin, ciprofloxacin and tetracycline, respectively. No major or very major errors were found.

**Conclusions.** The Etest results are equivalent to those obtained using the gold standard. The Etest is a valid method to determine susceptibility to tetracycline. It is also a suitable method to categorize strains classified as non-resistant to erythromycin and ciprofloxacin by the diffusion method.

**Keywords:** *Campylobacter*, antimicrobial susceptibility, erythromycin, ciprofloxacin, tetracycline, broth microdilution.

## INTRODUCCIÓN

En los países industrializados el enteropatógeno bacteriano más frecuentemente aislado de las heces de pacientes con gastroenteritis es *Campylobacter jejuni*<sup>1</sup>. El tratamiento antimicrobiano de la diarrea causada por *Campylobacter* spp. se considera indicado si ésta dura más de siete días, si el paciente está inmunocomprometido, gravemente deshidratado o con fiebre persistente o si emite más de 8 deposiciones al día o heces sanguinolentas<sup>1,2</sup>. El agente de primera elección es eritromicina<sup>1</sup>; las fluoroquinolonas son una buena alternativa si la cepa causante es sensible a ellas<sup>3</sup>; por último, las tetraciclinas pueden ser una opción si el paciente es mayor de 9 años<sup>2</sup>. Dado que se han descrito resistencias a todos los antimicrobianos citados<sup>4</sup>, cuando sea preciso administrar tratamiento específico es aconsejable disponer del estudio de susceptibilidad de la cepa implicada<sup>3</sup>.

En el año 2006 el Clinical Laboratory Standards Institute

Correspondencia:  
María Teresa Pérez Pomata  
Servicio de Microbiología. Hospital de Móstoles. C/ Río Júcar, s.n. Móstoles 28935,  
Madrid.  
Tel: 916648695.  
Fax: 916476371  
E-mail: tperez.hmtl@salud.madrid.org.

(CLSI) estableció que el método de referencia para el estudio de la susceptibilidad de *C. jejuni* y *Campylobacter coli* es el de microdilución en caldo (MDC), y fijó los rangos aceptables para la cepa patrón, así como los puntos de corte para eritromicina, ciprofloxacino, tetraciclina y doxicilina<sup>5</sup>. Además, definió los criterios de resistencia a eritromicina y ciprofloxacino por difusión con discos, recomendando determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cepas no resistentes para categorizarlas adecuadamente<sup>5</sup>. Sin embargo, la técnica de microdilución es compleja y no resulta práctica para estudiar cepas aisladas. Por otro lado, el Etest (AB Biomerieux, Solna, Suecia) es un método comercial que permite determinar las CMI de los aislados clínicos de forma individual pero no hay puntos de corte establecidos.

El propósito del presente estudio fue evaluar la precisión del Etest para categorizar la susceptibilidad de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli* frente a eritromicina, ciprofloxacino y tetraciclina empleando los puntos de corte recomendados por el CLSI para MDC<sup>5</sup>. El método de referencia fue el de microdilución en caldo descrito por el CLSI<sup>5</sup>.

## MÉTODOS

Con objeto de incluir cantidades parecidas de cepas resistentes y no resistentes, se seleccionaron 90 de entre las 450 aisladas de las heces de otros tantos pacientes desde el 1 de mayo de 2008 hasta el 30 de abril de 2011. La selección se llevó a cabo atendiendo a los resultados obtenidos del estudio de susceptibilidad realizado mediante difusión con discos de eritromicina (15 µg), ciprofloxacino (5 µg) y tetraciclina (30 µg) siguiendo el método recomendado por el CLSI<sup>5</sup>; las placas fueron incubadas a 42°C durante 24 horas en atmósfera microaerófila. Los puntos de corte empleados para clasificar la sensibilidad fueron los propuestos por Gaudreau en el caso de tetraciclina<sup>6</sup> y los establecidos por el CLSI<sup>5</sup> en los de eritromicina y ciprofloxacino. De los 90 aislados incluidos 75 fueron estudiados frente a eritromicina y ciprofloxacino y 84 frente a tetraciclina.

Se estudió la actividad hipurica de las 90 cepas seleccionadas, utilizando como controles *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 y un aislado de *C. coli* identificado mediante una modificación de la reacción en cadena de la polimerasa descrita por Mateo et al.<sup>7</sup>. Los aislados que no hidrolizaban el hipurato fueron identificados a nivel de especie utilizando la antedicha reacción en cadena de la polimerasa. Resultaron ser 74 cepas de *C. jejuni* y 16 cepas de *C. coli*.

El Etest<sup>®</sup> se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante<sup>8</sup> empleando placas de agar Mueller Hinton con sangre (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). La técnica de MDC se realizó según el procedimiento recomendado por el CLSI<sup>5</sup> en paneles con caldo Mueller Hinton suplementado con cationes (Becton-Dickinson, Sparks, USA) y sangre lisada de caballo al 5% preparados en nuestro laboratorio. Los intervalos de CMI estudiados fueron: eritromicina de 0,5 a 128 mg/l, ciprofloxacino de 0,25 a 64 mg/l y tetraciclina de 0,5 a 32 mg/l. En todas las series de

Etest y microdilución se incluyó como control la cepa patrón *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 48 horas en atmósfera microaerófila. Para poder comparar ambos métodos, las CMI obtenidas mediante Etest que se encontraban entre dos diluciones de MDC se redondearon a la inmediatamente superior.

La significación estadística de la concordancia de categoría se valoró mediante el índice kappa ( $\kappa$ ); los intervalos fueron calculados para un nivel de confianza del 95%.

## RESULTADOS

Según los resultados del método de referencia 10 cepas fueron resistentes y 65 sensibles a eritromicina; frente a ciprofloxacino, 38 fueron resistentes, 35 sensibles y dos intermedias; en cuanto a tetraciclina, 45 cepas fueron resistentes, 38 sensibles y una intermedia.

La concordancia entre la categoría obtenida mediante Etest y la establecida según el método de referencia fue 100% para eritromicina, 97% ( $\kappa=0,94$ , IC: 0,88-1) para ciprofloxacino y 98% ( $\kappa= 0,95$ , IC: 0,89-1) para tetraciclina. En la tabla 1 se exponen los cuatro errores de categorización del método en estudio; ninguno de ellos fue grave o muy grave.

En la tabla 2, donde se comparan las CMI obtenidas por ambos métodos, se observa que Etest tiende a producir CMI más altas que MDC frente a los tres antimicrobianos.

**Tabla 1** Errores de categorización de Etest. En la columna de la izquierda se exponen los resultados del método de referencia (MDC), en la central los de Etest (Etest) y en la de la derecha el número de cepas en las que se produjeron los errores (n).

	MDC	Etest	n
Ciprofloxacino	Intermedio	Sensible	1
	Intermedio	Resistente	1
Tetraciclina	Sensible	Intermedio	1
	Intermedio	Resistente	1

## DISCUSIÓN

El nivel de concordancia de categoría y la ausencia de errores graves y muy graves encontrados en nuestro trabajo indican que el método Etest es válido para categorizar las cepas clasificadas como no resistentes a eritromicina y ciprofloxacino mediante el método de difusión. También parece ser adecuado para determinar la susceptibilidad frente a tetraciclina, antimicrobiano para el que el CLSI no ha establecido puntos de corte de difusión con discos<sup>5</sup>.

**Tabla 2** Comparación de las CMI's obtenidas mediante Etest con las obtenidas mediante el método de referencia (MDC).

Antimicrobiano	Nº de CMI's de Etest que diferían de las del método de referencia en las diluciones indicadas							
	-2	-1	Concordante	+1	+2	+3	+4	+5
Eritromicina	0	3	24 (31%)	36	11	1	0	0
Ciprofloxacino	1	3	39 (51%)	9	11	8	3	1
Tetraciclina	0	1	67(80%)	8	4	2	2	0

Si bien la correlación entre Etest y métodos de dilución ha sido evaluada con anterioridad<sup>9-13</sup>, sólo hemos encontrado un estudio que comparase con el método aprobado por el CLSI<sup>14</sup>. En el mencionado trabajo se valoraba la concordancia de los resultados de susceptibilidad de 36 cepas de *C. jejuni* y 12 de *C. coli* frente a eritromicina, con resultados superponibles a los nuestros. Sin embargo, en lo que respecta a ciprofloxacino y tetraciclina no hemos encontrado estudios que utilicen como referencia la metodología y los puntos de corte definidos por el CLSI para *Campylobacter* spp.

En conclusión, el método Etest puede constituir una alternativa sencilla y práctica para aquellos laboratorios de Microbiología que, siguiendo las recomendaciones del CLSI, consideren oportuno confirmar la susceptibilidad de las cepas no resistentes a eritromicina y ciprofloxacino determinando su CMI. Por lo que respecta a tetraciclina, aunque su papel en la terapéutica específica de las diarreas por *Campylobacter* spp. se ve muy restringido por la escasez de cepas resistentes a eritromicina, en casos concretos puede representar la única alternativa de administración oral. Por lo tanto, el estudio de la susceptibilidad de los aislados de *Campylobacter* spp. a este antimicrobiano también puede ser de interés clínico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Butzler JP. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 868-76.
- Allos BA, Blaser MJ. *Campylobacter jejuni* and related species. En: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of infectious diseases [Libro en Internet]. 7ª ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2009 [consultado 28 de junio de 2011]. Disponible en: <http://www.mdconsult.com>
- Fitzgerald C, Nachamkin I. *Campylobacter* and *Arcobacter*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington, DC: ASM Press; 2007. p. 933-46.
- Lehtopolku M, Nakari UM, Kotilainen P, Huovinen P, Siitonen A, Hakanen AJ. Antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Strains: in vitro activities of 20 antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:1232-36.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved guideline. CLSI document M45-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
- Gaudreau C, Girouard Y, Gilbert H, Gagnon J, Bekal S. Comparison of disk diffusion and agar dilution methods for erythromycin, ciprofloxacin, and tetracycline susceptibility testing of *Campylobacter coli* and for tetracycline susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:4475-77.
- Mateo E, Cárcamo J, Urquijo M, Perales I, Fernández-Astorga A. Evaluation of a PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail poultry products. Res Microbiol 2005; 156:568-74.
- AB bioMérieux. Etest Application Sheet 016: *Campylobacter* spp. En: Etest Technical Manual. 2007 [consultada 1 febrero 2010] Disponible en: [http://www.abbiobios.com/pdf/etm\\_html/14\\_etm](http://www.abbiobios.com/pdf/etm_html/14_etm).
- Luber P, Bartelt E, Genschow E, Wagner J, Hahn H. Comparison of broth microdilution, E-test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Clin Microbiol 2003; 41:1062-8.
- Oncul O, Zarakolu P, Oncul O, Gur D. Antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter jejuni*: a comparison between Etest and agar dilution method. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 45:69-71.
- Ge B, Bodeis S, Walker RD, White DG, Zhao S, McDermott PF et al. Comparison of the Etest and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. J Antimicrob Chemother 2002; 50:487-94.
- Varela NP, Friendship R, Dewey C, Valdivieso A. Comparison of agar dilution and Etest for antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter coli* isolates recovered from 80 Ontario swine farms. Can J Vet Res 2008; 72:168-74.
- Valdivieso-García A, Imgrund R, Deckert A, Varughese BM, Harris K, Bunimov N et al. Cost analysis and antimicrobial susceptibility testing comparing the Etest and the agar dilution method in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 65:168-74.
- Van der Beek MT, Claas ECJ, Mevius DJ, van Pelt W, Wagenaar JA, Kuijper EJ. Inaccuracy of routine susceptibility tests for detection of erythromycin resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Clin Microbiol Infect 2010; 16:51-6.