

Comparación de tres métodos para determinar la sensibilidad a imipenem y meropenem en *Acinetobacter baumannii* con fenotipo heterorresistente a carbapenemes

Felipe Fernández-Cuenca^a, Pilar Egea^a, Lorena López-Cerero^{a,b}, Paula Díaz-De Alba^a, Jordi Vila^c y Álvaro Pascual^{a,b}

^aServicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. ^bFacultad de Medicina. Universidad de Sevilla. Sevilla. ^cServicio de Microbiología. Centro de Diagnóstico Biomédico. Hospital Clínic. IDIBAPS. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

INTRODUCCIÓN. Se ha determinado la concordancia entre tres métodos para determinar la sensibilidad a imipenem (IMP) y meropenem (MPM) en *Acinetobacter baumannii* heterorresistente a carbapenemes (Hr-CP).

MÉTODOS. Se incluyen 30 aislados de *A. baumannii* pertenecientes a 6 clones (REP-PCR) y con concentración inhibitoria mínima (CIM) (mg/l) de IMP o MPM determinadas por Wider entre ≤ 1 y ≥ 8 . Las CIM obtenidas con Wider se compararon con las determinadas por microdilución y E-test. Los errores de categoría clínica se determinaron usando la microdilución como método de referencia.

RESULTADOS. Un total de 25 aislados fueron Hr-CP (presencia de colonias dentro de los halos de inhibición de tiras de E-test y discos). En los aislados Hr-CP la concordancia en las CIM ($\pm 1\log_2$) fue: Wider frente a microdilución (el 96%, IMP; el 100%, MPM), Wider frente a E-test (el 50%, IMP; el 64%, MPM), microdilución frente a E-test (el 64%, IMP; el 60%, MPM). No se observaron errores máximos. Los errores menores y los mayores para IMP fueron: Wider frente a microdilución (el 40 y el 0%), E-test frente a microdilución (el 40 y el 12%) y disco frente a microdilución (el 36 y el 8%). Considerando las colonias que crecen dentro de los halos de inhibición (E-test y discos), la concordancia en las CIM fue: Wider frente a E-test (el 8%, IMP; el 12%, MPM), MD frente a E-test (el 8% IMP y MPM). En este caso tampoco se observaron errores máximos, mientras que los errores menores y los mayores fueron: E-test frente a microdilución (el 40 y el 48%) y disco frente a microdilución (el 40 y el 48%).

CONCLUSIÓN. Los métodos de microdilución en caldo (Wider y microdilución) no son útiles para detectar subpoblaciones de aislados de *A. baumannii* Hr-CP.

Palabras clave: *Acinetobacter baumannii*. Heterorresistencia. Carbapenemes.

Comparison of 3 methods for determining sensitivity to imipenem and meropenem in *Acinetobacter baumannii* with a carbapenem-heteroresistant phenotype

INTRODUCTION. We assessed agreement among 3 assays for determining susceptibility to imipenem (IMP) and meropenem (MPM) of *Acinetobacter baumannii* (Ab) heteroresistant to carbapenems (Hr-CP).

METHODS. Thirty Ab clinical isolates belonging to 6 clones (REP-PCR) were studied, in which IMP and MPM MICs were between ≤ 1 and ≥ 8 mg/l by Wider system. MICs determined by Wider were compared with those obtained by microdilution (MD) and E-test. Errors in the clinical category were determined considering MD as the reference method.

RESULTS. Twenty-five Ab were Hr-CP (growth of resistant colonies within the inhibition area of disks and E-test strips). Agreement for the MICs ($\pm 1\log_2$) in Hr-CP colonies was as follows: Wider vs. MD (96% IMP, 100% MPM), Wider vs. E-test (50% IMP, 64% MPM), MD vs. E-test (64% IMP, 60% MPM). Major errors were not observed. Minor errors and moderate errors for IMP included Wider vs. MD (40% and 0%), E-test vs. MD (40% and 12%), and disks vs. MD (36% and 8%). Agreement for the MICs considering colonies growing within the inhibition areas (E-test and disks) was Wider vs. E-test (8% IMP, 12% MPM), and MD vs. E-test (8% IMP and MPM). Major errors were not observed in this case either; minor errors and moderate errors for IMP were seen in E-test vs. MD (40% and 48%), and disks vs. MD (40% and 48%).

CONCLUSION. Susceptibility testing methods based on microdilution (Wider system and MD) are not useful to detect subpopulations of Ab Hr-CP.

Key words: *Acinetobacter baumannii*. Heteroresistance. Carbapenems.

Introducción

Acinetobacter baumannii es un patógeno oportunista considerado de baja virulencia que se caracteriza por su gran capacidad de diseminación en el ambiente hospitalario y por su facilidad para adquirir resistencia a los antimicrobianos usados en clínica, incluidos los de amplio es-

Correspondencia: Dr. F. Fernández-Cuenca. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Avda. Doctor Fedriani, 3. 41009 Sevilla. España. Correo electrónico: felipefc@us.es

pectro, como los carbapenemes¹. La resistencia a carbapenemes en *A. baumannii* suele estar mediada por la producción de betalactamasas (fundamentalmente oxacilinasas y, en menor medida, metalo-betalactamasas)^{1,2}, aunque no se pueden descartar otros mecanismos de resistencia, como la hiperproducción de AMPc en cepas deficientes en porinas, la sobreexpresión de bombas de flujo o alteraciones en las proteínas fijadoras de penicilina³.

El fenómeno de heterorresistencia a los antimicrobianos consiste en la presencia de subpoblaciones resistentes minoritarias en una población sensible. La heterorresistencia en *A. baumannii* se ha descrito con colistina⁴ y los carbapenemes⁵ y puede detectarse fenotípicamente por la presencia de colonias en el interior del halo de inhibición de discos o tiras de E-test. No existen datos en la literatura médica sobre la utilidad de los métodos de microdilución en caldo para detectar cepas de *A. baumannii* heterorresistente a carbapenemes. Además, se desconoce cuál es la causa o los mecanismos de resistencia a carbapenemes implicados en estas cepas y no existe experiencia sobre la utilidad clínica de carbapenemes en infecciones causadas por cepas de *A. baumannii* heterorresistente a carbapenemes.

El objetivo de este estudio fue determinar si existe concordancia entre tres métodos para determinar la sensibilidad/resistencia a carbapenemes de *A. baumannii* con fenotipo heterorresistente a carbapenemes.

Métodos

Se incluyen 30 aislados clínicos de *A. baumannii* obtenidos desde febrero de 2006 hasta enero de 2007 de muestras de orina (n = 14), aspirado traqueal/bronquial (n = 10), exudado de herida (n = 4), sangre (n = 1), y líquido ascítico (n = 1) de pacientes ingresados en el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. Los aislados se seleccionaron en función de las cantidades inhibitorias mínimas (CIM) de imipenem o meropenem determinadas con el sistema Wider I (Francisco Soria Melguizo, S.A., Madrid, España): ≤ 1 mg/l (4 aislados); 2, 4 u 8 mg/l (24 aislados); y ≥ 8 mg/l (2 aislados). La identificación bacteriana se realizó usando los sistemas Wider I y Api 20 NE (bioMérieux API, Marcy l'Étoile, Francia) y el crecimiento a 44 °C en caldo común. La relación clonal de los aislados se determinó mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de elementos palindrómicos extragenómicos repetitivos (REP-PCR)⁶. El medio utilizado para determinar la heterorresistencia fue agar Mueller-Hinton (Difco, España). La heterorresistencia a carbapenemes se definió por la presencia de colonias de *A. baumannii* en el interior de los halos de inhibición de tiras de E-test (AB Biodisk, Suecia) y discos (Oxoid, España) con imipenem y/o meropenem.

Las CIM de imipenem y meropenem se determinaron mediante Wider I, microdilución en caldo Mueller-Hinton (recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI])⁷ y E-test. Las lecturas fueron realizadas por tres observadores. Los resultados de CIM determinados por dos métodos se consideraron concordantes si existía una diferencia de $\pm 1 \log_2$. Los errores de categoría clínica se determinaron comparando los resultados obtenidos con Wider I, E-test y discos con los determinados por microdilución (método de referencia).

Con el objeto de determinar la frecuencia de las subpoblaciones heterorresistentes se utilizó un aislado (*Acinetobacter baumannii* 98.06 [Ab 98.06]) representativo del clon más prevalente. Se prepararon placas de agar con concentraciones de imipenem y meropenem equivalentes a 2, 4, 8 y 16 veces su respectivo valor de CIM (8 mg/l para imipenem y 4 mg/l para meropenem) y se inocularon con 0,1 ml de una suspensión bacteriana del aislado Ab 98.06 preparada en solución salina a una concentración equivalente a un 0,5 de McFarland.

El aislado Ab 98.06 y una de las colonias que crecen dentro del halo de inhibición con meropenem se subcultivaron 10 veces en agar sin meropenem y en agar con meropenem en una concentración de 2 mg/l. Posteriormente se determinó si el fenómeno de heterorresistencia se reproducía usando tiras de E-test y discos de meropenem.

Resultados

Se obtuvieron seis patrones diferentes de REP-PCR o genotipos (2, 3, 4, 6, 9A y 9B). El 67% de los aislados pertenecían al mismo clon y el 83% de los 30 aislados fueron heterorresistentes a carbapenemes (fig. 1). La relación entre genotipo y CIM de imipenem fue: genotipo 9A (dos aislados; CIM de 0,5 y 2 mg/l, respectivamente), genotipo 9B (un aislado; CIM de 0,5 mg/l), genotipo 4 (uno aislado; CIM de 4 mg/l), genotipo 3 (un aislado; CIM de 64 mg/l), genotipo 2 (cuatro aislados; CIM de 0,5, 2, 4 y 8 mg/l, respectivamente) y genotipo 6 (21 aislados; CIM de 0,5 mg/l para un aislado, 2 mg/l para un aislado, 4 mg/l para nueve aislados, 8 mg/l para nueve aislados y 16 mg/l para un aislado).

El análisis de los resultados se realizó de dos maneras, una sin considerar las colonias resistentes que crecen en el interior de los halos de inhibición de las tiras de E-test y los discos de imipenem y/o meropenem, y otra considerando dichas colonias. En los aislados heterorresistentes, la concordancia en las CIM de imipenem y meropenem sin considerar las colonias resistentes fue la siguiente: el 96% para imipenem y el 100% para meropenem al comparar Wider I y la microdilución, el 50% para imipenem y el 64% para meropenem al comparar Wider I y E-test, y el 64% para imipenem y el 60% para meropenem al comparar la microdilución y E-test. Los resultados discrepantes obtenidos al comparar los tres métodos (Wider I y microdilución, Wider I y E-test, microdilución y E-test) se debieron a que las CIM obtenidas con el primer método fueron cuatro o más veces más bajas que las determinadas por el segundo método.

La concordancia en las CIM de imipenem y meropenem teniendo en cuenta las colonias resistentes de los aislados heterorresistentes fue: el 8% para imipenem y el 12% para meropenem al comparar Wider I y E-test, y el 8% para imipenem y meropenem al comparar la microdilución y E-test.

Al comparar las categorías clínicas para imipenem y meropenem no se observaron errores máximos (aislado sensible por Wider I, E-test o discos y resistente por microdilución). Como puede verse en la tabla 1, los errores menores y los errores mayores (aislado resistente por Wider I, E-test o discos y sensible por microdilución) fueron muy elevados, especialmente cuando se compara la microdilución frente a los métodos de difusión en agar (E-test y discos) y se consideran las colonias que crecen en el interior de los halos de inhibición.

En los aislados no heterorresistentes la concordancia en las CIM de imipenem y meropenem fue del 100% para imipenem y meropenem al comparar Wider I y la microdilución, y del 100% para imipenem y el 75% para meropenem al comparar Wider I y la microdilución frente a E-test.

Las frecuencias de las subpoblaciones resistentes a carbapenemes en presencia de concentraciones de meropenem de 8 y 16 mg/l fueron superiores ($8-2 \times 10^{-7}$ ufc/ml) a

las obtenidas en presencia de 8 mg/l de imipenem (3×10^{-8} ufc/ml). En ninguna de las demás concentraciones evaluadas (32-128 mg/l para meropenem y 16-128 mg/l para imipenem) se observó crecimiento de colonias.

Después de subcultivar 10 veces el aislado Ac 98.06 y una colonia resistente a carbapenemes en un medio con carbapenemes las CIM de imipenem y meropenem se incrementaron hasta valores mayores o iguales a 32 mg/l (E-test) y presentaron heterorresistencia a carbapenemes (difusión con discos). La colonia resistente a carbapenemes subcultivada en medio sin carbapenemes reprodujo la heterorresistencia a imipenem y meropenem de igual modo que el aislado Ac 98.06.

Discusión

La heterorresistencia a carbapenemes en *A. baumannii* fue descrita por primera vez en 2005 por Pournaras et al⁵. Éste es el único estudio relacionado con la heterorresistencia a carbapenemes que se ha publicado hasta el momento, lo que explica que aún se desconozcan aspectos básicos como la prevalencia de las cepas de *A. baumannii* heterorresistente a carbapenemes y los mecanismos de resistencia implicados. Además, dado que no hay estudios que valoren la eficacia de los carbapenemes en infecciones causadas por *A. baumannii* heterorresistente a carbapenemes, este fenotipo de resistencia debe ser detectado en el laboratorio, puesto que es probable que dichas subpoblaciones resistentes se seleccionen en presencia de imipenem o meropenem produciendo o condicionando el fracaso terapéutico.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que existe una buena concordancia cuando se comparan entre sí los dos métodos basados en la microdilución (Wider I y microdilución). En cambio, la correlación entre los métodos basados en la microdilución y los métodos basados en la difusión en agar (E-test y discos) es muy baja, sobre todo cuando la lectura e interpretación de los resultados se realiza teniendo en cuenta las colonias resistentes que crecen en el interior de los halos de inhibición de las tiras de E-test. Las discrepancias en las CIM de imipenem y meropenem obtenidas mediante E-test se debieron a que con este método los valores de CIM fueron cuatro veces o más superiores a las determinadas con el sistema Wider I o la microdilución. Estas discrepancias se tradujeron en un elevado porcentaje de errores menores y errores mayores, que fue particularmente más evidente en los aislados en los que las CIM fueron iguales al punto de corte de 4 mg/l establecido por el CLSI para imipenem y meropenem.

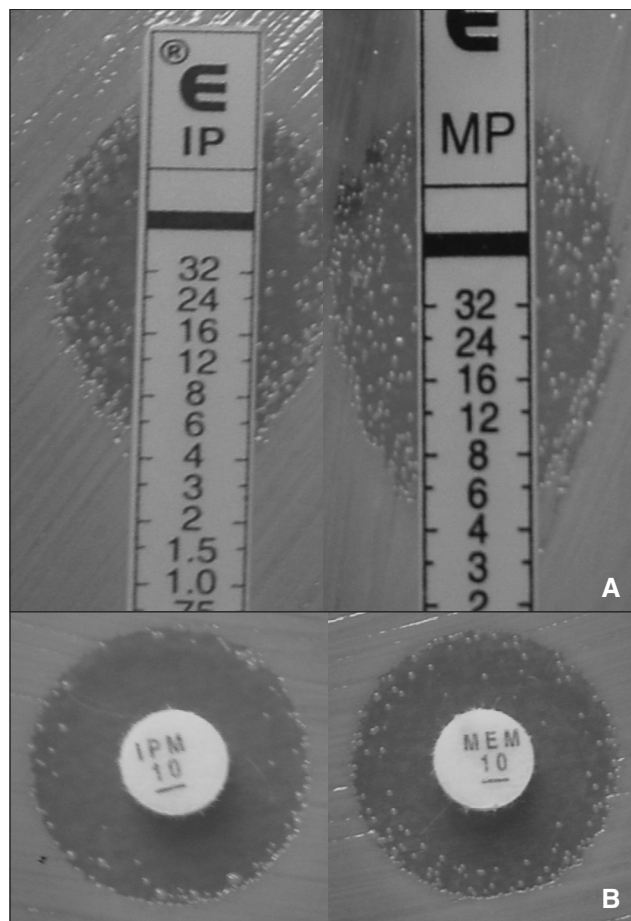


Figura 1. Detección de heterorresistencia a imipenem y meropenem en *Acinetobacter baumannii* mediante E-test (panel A) y difusión con discos (panel B).

Entre las posibles causas o factores que podrían explicar las discrepancias observadas en este estudio habría que considerar la composición o el tipo de medio con agar usado para detectar la heterorresistencia. Sin embargo, aún no hay datos disponibles para *A. baumannii* heterorresistente que apoyen esta hipótesis.

Posiblemente, las diferencias observadas con los métodos de microdilución y difusión en agar se deban a que la concentración de inóculo usada en los métodos de microdilución ($2,5 \times 10^4$ ufc/pocillo; método de referencia) es unas 200 veces inferior a la usada en los métodos de difusión en agar ($0,5 \times 10^7$ ufc/placa). La frecuencia con la que aparecían subpoblaciones resistentes a imipenem y mero-

TABLA 1. Errores en las categorías clínicas para imipenem y meropenem en los aislados de *A. baumannii* heterorresistentes a carbapenemes

Métodos	Imipenem		Meropenem	
	Errores menores (%)	Errores mayores (%)	Errores menores (%)	Errores mayores (%)
Wider I frente a microdilución	40	0	16	0
E-test frente a microdilución	40 (40)	12 (48)	48 (32)	12 (56)
Discos frente a microdilución	36 (40)	8 (48)	60 (32)	4 (56)

Entre paréntesis se expresan los porcentajes obtenidos si se consideran las colonias que crecen dentro de los halos de inhibición de las tiras de E-test y los discos.

penem fue relativamente baja (3×10^{-8} ufc/ml para imipenem y $2-8 \times 10^{-7}$ ufc/ml para meropenem), lo que podría explicar en parte por qué no se detectan estas subpoblaciones cuando se utilizan métodos para determinar la sensibilidad a carbapenemes basados en la microdilución. La frecuencia de las subpoblaciones heterorresistentes a meropenem fue unas 10 veces más elevada que la de las subpoblaciones resistentes a imipenem. Esta observación puede explicar por qué en los aislados de *A. baumannii* heterorresistentes estudiados el número de colonias resistentes que crecen en el interior de los halos de inhibición es siempre mayor con meropenem que con imipenem.

Después de varios subcultivos en ausencia de carbapenemes la subpoblación resistente derivada del aislado Ab 98.06 se comportó igual que la población heterorresistente. Este fenómeno es idéntico al descrito por Pournaras et al⁵ con aislados de *A. baumannii* heterorresistentes a carbapenemes procedentes de Grecia, y sugiere que la heterorresistencia podría estar más relacionada con la inducción de resistencia en la población heterorresistente en presencia de carbapenemes que con la selección de subpoblaciones resistentes estables.

A diferencia de los resultados obtenidos por Pournaras et al⁵ con los subcultivos de las subpoblaciones resistentes y del aislado heterorresistente de nuestro estudio determinadas tras varios subcultivos con imipenem o meropenem, se incrementó al menos dos diluciones, lo que sugiere que pueden existir diferencias en los mecanismos implicados en la heterorresistencia de las cepas de *A. baumannii* usadas en el estudio de Pournaras et al⁵ y las cepas de *A. baumannii* de nuestro estudio.

Finalmente, cabe destacar que los dos clones mayoritarios de nuestro estudio (clones 6 y 2) estuvieron representados por aislados heterorresistentes, y por uno o varios

aislados no heterorresistentes, lo que indicaría que en *A. baumannii* la clonalidad no está relacionada con la heterorresistencia a carbapenemes.

En conclusión, los métodos de determinación de la sensibilidad a carbapenemes basados en la microdilución en caldo no son útiles para detectar *A. baumannii* con fenotipo heterorresistente a carbapenemes.

Agradecimientos

Financiado por el Ministerio de Sanidad y Consumo, el Instituto de Salud Carlos III-FEDER y la Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD06/0008).

Bibliografía

1. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanism and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:826-36.
2. Ruiz M, Martí S, Fernández Cuenca F, Pascual A, Vila J. High prevalence of Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinases in epidemiological unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:1192-8.
3. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:1210-5.
4. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, Liolios L. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:2946-50.
5. Pournaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Maniatis AN, Tsakris A. Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55:1055-6.
6. Bou G, Cervero G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.* 2000;6:635-43.
7. Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Approved Standard M100-S15. Villanova, PA: CLSI; 2005.