



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

[www.elsevier.es/eimc](http://www.elsevier.es/eimc)



Original

## Comparación entre dilución en agar y otras 3 técnicas para la determinación de la sensibilidad de 228 aislamientos clínicos de bacilos gramnegativos no fermentadores

Jose Luis Gómez-Garcés\*, Belén Aracil y Yolanda Gil

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Móstoles, Móstoles, Madrid, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 7 de marzo de 2008

Aceptado el 8 de octubre de 2008

On-line el 5 de mayo de 2009

#### Palabras clave:

Antibiograma

Difusión con disco

Etest

Bacilos gramnegativos no fermentadores

### RESUMEN

**Introducción:** La determinación de la sensibilidad de los bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNF) es problemática y se necesitan alternativas que resulten válidas.

**Métodos:** En esta serie se estudió un total de 228 aislamientos clínicos de BGNF que incluían 85 cepas de *Acinetobacter* spp., 80 cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*, 50 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y otros 13 BGNF (8 cepas de *Ralstonia pickettii* y 5 cepas de *Burkholderia cepacia*) mediante dilución en agar como método de referencia, y se compararon los resultados obtenidos con los métodos de difusión con discos, Etest y el sistema de microdilución VITEK 2 Compact System.

**Resultados:** El método de difusión con discos resulta inaceptable para *S. maltophilia* y para *P. aeruginosa*; ésta última fundamentalmente por su mala concordancia con colistina, aunque es válido para *Acinetobacter* spp. y para los restantes BGNF. El sistema de microdilución VITEK 2 Compact System obtiene malos resultados para piperacillina-tazobactam, tigeciclina y ceftazidima con *S. maltophilia*. Resultan llamativos los porcentajes de errores menores con el VITEK 2 Compact System y el Etest para tigeciclina frente a *Acinetobacter* spp. y a *S. maltophilia*, probablemente debidos a la influencia en la distinta composición de los lotes de agar Muller-Hinton, lo que obliga a ser cauto en la interpretación de los resultados obtenidos por este último método.

**Conclusión:** El método de difusión con discos no es adecuado para *S. maltophilia*. El método es también inadecuado para *P. aeruginosa* y colistina. Los métodos Vitek 2 Compact System y Etest presentan errores menores para *S. maltophilia* y *Acinetobacter* spp. frente a tigeciclina.

© 2008 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Comparison between agar dilution and three other methods for determining the susceptibility of 228 clinical isolates of non-fermenting gram-negative rods

### ABSTRACT

#### Keywords:

Antibiogram

Disk Diffusion

Etest

Gram-negative non-fermenting rods

**Introduction:** Susceptibility testing for non-fermenting gram-negative rods (NFGNR) is problematic; valid methods are needed for this purpose.

**Methods:** In this study, 228 NFGNR clinical isolates were evaluated, including 85 *Acinetobacter* spp., 80 *Stenotrophomonas maltophilia*, 50 *Pseudomonas aeruginosa*, and 13 other species (8 *Ralstonia pickettii* and 5 *Burkholderia cepacia*). Agar dilution was used as the reference method, and results were compared with those obtained by disk diffusion, Etest, and microdilution performed with the VITEK 2 Compact System.

**Results:** The disk method was unacceptable for *S. maltophilia* and *P. aeruginosa*, in the latter organism, mainly because of poor agreement in the colistin results. Nonetheless, the disk method is valid for *Acinetobacter* spp. and the remaining NFGNRs. The VITEK 2 Compact System yielded poor results for piperacillin-tazobactam, tigecycline, and ceftazidime in *S. maltophilia*. There were minor discrepancies with the VITEK 2 Compact system and the Etest for tigecycline in *Acinetobacter* spp. and *S. maltophilia*, likely because of the differing composition of the Muller-Hinton agar lots. Hence, Etest results should be interpreted with caution.

**Conclusion:** The disk diffusion method is inadequate for *S. maltophilia*. This method is unacceptable for testing colistin in *P. aeruginosa*. The methods Vitek 2 Compact System and Etest show minor discrepancies for testing *S. maltophilia* and *Acinetobacter* spp. for tigecycline.

© 2008 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [jlgarces@microb.net](mailto:jlgarces@microb.net) (J.L. Gómez-Garcés).

## Introducción

Los bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF), fundamentalmente *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* y *Pseudomonas aeruginosa*, se encuentran entre los patógenos más problemáticos a la hora de su erradicación, especialmente en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatología y otras unidades clínicas que atienden a pacientes de riesgo<sup>1,2</sup>. El tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos es habitualmente difícil debido a que presentan patrones de resistencia a múltiples antibióticos<sup>3–5</sup>.

Por otra parte, la determinación de la sensibilidad in vitro de estos microorganismos es problemática y, en ocasiones, poco satisfactoria<sup>6,7</sup>. El método de difusión con discos no es reproducible para la mayoría de estas cepas y, en consecuencia, resulta muchas veces poco apropiado para obtener información útil en el tratamiento de estas infecciones<sup>8,9</sup>. Los métodos de dilución son los métodos recomendados para estos microorganismos y aunque el Etest se ofrece como una posible técnica alternativa, también su aplicación en algunos casos parece tener limitaciones<sup>10</sup>.

Se han empleado diferentes sistemas automatizados en la identificación y en la determinación de la sensibilidad de los microorganismos más relevantes en clínica. El sistema de microdilución VITEK 2 Compact System (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) es un sistema para la monitorización de la cinética de crecimiento bacteriano y el cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) mediante la utilización de un único algoritmo. Desgraciadamente algunos estudios han mostrado errores asociados a la determinación de la sensibilidad de varios agentes antimicrobianos cuando se refieren a BGNNF<sup>8</sup>.

El objetivo de este estudio es evaluar la validez de diferentes métodos: difusión con discos, Etest y el sistema automatizado VITEK 2 Compact System, y compararlos con el método de dilución en agar, considerado como método de referencia para la determinación de la sensibilidad de 85 cepas de *Acinetobacter* spp., 80 cepas de *S. maltophilia*, 50 cepas de *P. aeruginosa* y otros 13 BGNNF (8 cepas de *Ralstonia pickettii* y 5 cepas de *Burkholderia cepacia*) frente a 7 agentes antimicrobianos potencialmente útiles en el tratamiento de las diferentes infecciones causadas por estos microorganismos.

## Material y métodos

### Microorganismos

Se estudió un total de 228 BGNNF que incluían 85 cepas de *Acinetobacter* spp., 80 cepas de *S. maltophilia*, 50 cepas de *P. aeruginosa* y otros 13 BGNNF (8 cepas de *R. pickettii* y 5 cepas de *B. cepacia*). Todos los aislamientos procedían de muestras clínicas obtenidas en un período de tiempo comprendido entre 1996 y 2006. Las cepas control fueron las cepas de referencia: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 28753, que se incluyeron en cada experimento realizado.

Todos los aislamientos se identificaron mediante métodos recomendados y empleados habitualmente en este laboratorio<sup>11</sup>.

### Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias por el método de dilución en agar

El CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) considera la determinación de las CMI por dilución en agar como un método de referencia para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana de los BGNNF<sup>12</sup>.

Cada fabricante suministró los agentes antimicrobianos en forma de sustancia valorada y especificó la potencia de cada uno: tigeciclina (Wyeth-Ayerst, West Chester, PA, EE. UU.), piperacilina-tazobactam (Wyeth-Ayerst, West Chester, PA, EE. UU.), ceftazidima (Glaxo, Barcelona, España), imipenem (Merk, Rahway, NJ, EE. UU.), gentamicina (Sigma, Steinheim, Alemania), ciprofloxacino (Bayer, Leverkusen, Alemania) y colistina (Sigma-Chemical, St. Louis, MO, EE. UU.).

Se emplearon placas circulares de 90 mm de diámetro con 20 ml de agar Mueller-Hinton (Becton Dickinson, Le Point the Claix, Francia) y concentraciones determinadas de cada agente antimicrobiano en la proporción de 19 ml de medio por 1 ml de la solución correspondiente de agente antimicrobiano. Las placas y los controles de medio sin el agente antimicrobiano se utilizaron el mismo día de su preparación.

Cuatro o 5 colonias del microorganismo por estudiar se diluyeron en caldo Mueller-Hinton suplementado (Becton Dickinson, Le Point the Claix, Francia) para obtener una turbidez cercana al 0,5 de la escala de McFarland, equivalentes a  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. Previa dilución 1:10, se empleó un replicador de Steers que inoculó 1 µl en cada punto de contacto, lo que equivalía aproximadamente a  $10^4$  UFC de cada microorganismo por ml en placas de agar Mueller-Hinton. Las placas así inoculadas se incubaron a 35 °C de 16 a 20 h; a continuación se procedió a su lectura. Las CMI se definieron como la concentración más baja a la que sucedía una inhibición completa del crecimiento. No se valoró la presencia de una sombra o de una única colonia en el punto de inoculación<sup>12</sup>.

En el análisis de los resultados se utilizaron los criterios y los puntos de corte que recomienda el CLSI<sup>12</sup>, excepto para tigeciclina, que al no estar disponibles se utilizaron los que acepta la FDA (Food and Drug Administration) y el fabricante (Tygacil 2005, Tigecycline package insert; Wyeth Pharmaceuticals, Philadelphia, PA, EE. UU.).

### Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias por el método de gradiente de difusión (Etest)

Utilizando torundas de algodón, el inóculo de una suspensión de 0,5 de la escala McFarland de cada microorganismo se extendió sobre una placa de agar Mueller-Hinton (Becton Dickinson, Le Point the Claix, Francia) hasta cubrir la superficie completa de ésta. Las tiras de Etest se colocaron en la placa en posición radial y se incubaron en atmósfera de aire a 37 °C durante 18 h. En los casos en los que había sombras o crecimiento de colonias pequeñas en el punto de corte, se consideró como CMI la inmediatamente superior según la interpretación de acuerdo con las indicaciones del fabricante (AB Biodisk, Solna, Suecia).

### Difusión con discos

Siguiendo la técnica descrita anteriormente y utilizando discos de tigeciclina (15 µg), piperacilina-tazobactam (100/10 µg), ceftazidima (30 µg), imipenem (10 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacino (5 µg) y colistina (10 µg) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) se valoró el diámetro de inhibición de cada uno de estos siguiendo la normativa del CLSI<sup>12</sup> o, en el caso de tigeciclina, la normativa que indicó la FDA y el fabricante (Tygacil 2005, Tigecycline package insert; Wyeth Pharmaceuticals, Filadelfia, PA, EE. UU.).

### Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias mediante un sistema automatizado de microdilución (VITEK 2 Compact System)

La determinación de la sensibilidad con el sistema de microdilución VITEK 2 Compact System se llevó a cabo con las

tarjetas AST-N 057 de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las tarjetas contenían 64 pocillos con los siguientes agentes antimicrobianos como sustancia deshidratada y las siguientes concentraciones indicadas: ceftazidima: 1, 2, 8 y 32 µg/ml; ciprofloxacino: 0,5, 2 y 4 µg/ml; gentamicina: 4, 16 y 32 µg/ml; imipenem: 2, 4 y 16 µg/ml; piperacilina-tazobactam: 4/4, 16/4 y 128/4 µg/ml, y tigeciclina: 0,75, 2 y 4 µg/ml. Los resultados obtenidos con algunos agentes antimicrobianos incluidos en la tarjeta AST-N 057 (amikacina, amoxicilina con ácido clavulánico, ampicilina, aztreonam, cefalotina, cefepime, cefoxitina, cefuroxima, ácido nalidíxico, piperacilina y tobramicina) no se evaluaron en este estudio. Las tarjetas se inocularon usando  $8 \times 10^6$  UFC/ml a partir de 3 ml por tarjeta de una suspensión de 0,5 en la escala McFarland y posteriormente se sellaron; a continuación se procedió a su lectura. Aunque VITEK 2 Compact System determina automáticamente las CMI y su sistema experto corrige si es necesario los valores y la interpretación de estos según una base de datos interna de posibles fenotipos para cada microorganismo y para cada antibiótico, en este trabajo sólo se tuvieron en cuenta los valores de las CMI obtenidos, independientemente de la interpretación del sistema experto.

### Análisis de resultados

En este estudio el método de dilución en agar, uno de los 2 métodos que propuso el CLSI, se consideró como método de referencia. En esta comparación entre los diferentes métodos estudiados, se utilizaron los criterios y las categorías previamente descritas por Thornsberry y Gavan<sup>13</sup>: concordancia (en ambos métodos se obtienen interpretaciones idénticas de sensibilidad), discrepancia muy importante o error muy grave (el método de referencia indica que el microorganismo es resistente, aunque el método alternativo indica que el microorganismo es sensible), discrepancia importante o error grave (a la inversa, el método de referencia indica que el microorganismo es sensible, aunque el método comparativo indica que el microorganismo es resistente) y discrepancia menor o error menor (cuando se obtiene un resultado en el que los valores de CMI obtenidos por ambos métodos, aunque diferentes entre sí, no modifican la categorización de sensible o de resistente).

### Resultados

En las tablas 1–8 se expresan el rango, la CMI<sub>50</sub>, la CMI<sub>90</sub> y los porcentajes de cepas sensibles, intermedias y resistentes de cada grupo de microorganismos estudiados mediante dilución en agar y su comparación con los otros 3 métodos estudiados mediante la indicación de la concordancia, las discrepancias muy importantes o errores muy graves, las discrepancias importantes o error grave y las discrepancias menores o errores menores<sup>13</sup>.

**Tabla 1**

Sensibilidad in vitro de 85 aislados de *Acinetobacter* spp. a 7 agentes antimicrobianos mediante dilución en agar

Antibiótico	Rango	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Cepas sensibles, n (%)	Cepas intermedias, n (%)	Cepas resistentes, n (%)
Piperacilina-tazobactam	<4–>128	32	>128	26 (26)	23 (27)	40 (47)
Ceftazidima	<2–>32	8	>32	43 (50,6)	7 (8,2)	35 (41,2)
Imipenem	<1–>32	<1	>32	60 (70,6)	2 (2,36)	23 (27,04)
Gentamicina	<1–>32	<1	>32	47 (55,1)	2 (2,36)	36 (42,54)
Ciprofloxacino	<0,25–>8	<0,25	>8	47 (55,1)	1 (1,2)	37 (43,70)
Colistina	1–16	1	2	81 (95,3)	3 (3,5)	1 (1,2)
Tigeciclina	<0,12–4	0,25	2	82 (96,5)	3 (3,5)	0

CMI: concentración mínima inhibitoria.

Las tablas 1 y 2 hacen referencia a los aislados de *Acinetobacter* spp. Los resultados de concordancia tienen porcentajes superiores al 90% para todos los antibióticos probados, excepto para tigeciclina con la que se obtuvieron discrepancias menores o errores menores en el 19% con Etest y en el 12% con el sistema de microdilución Vitek 2 Compact System y para piperacilina-tazobactam con la que se obtuvieron discrepancias menores o errores menores en el 12% con el sistema de microdilución Vitek 2 Compact.

Las tablas 3 y 4 muestran los resultados obtenidos con *S. maltophilia*. En este microorganismo se observaron discrepancias importantes o errores graves de un 15% con difusión con discos y de un 21% con el sistema de microdilución Vitek 2 Compact System para piperacilina-tazobactam, de un 9% con difusión de discos para ceftazidima y de un 50% con difusión de discos para colistina. Los porcentajes de discrepancias menores o errores menores para tigeciclina son del 20% para Etest y del 15% para el sistema de microdilución Vitek 2 Compact System. Los resultados referidos a *P. aeruginosa* se muestran en las tablas 5 y 6 con concordancia superior al 90% para cualquier método y cualquier antibiótico, excepto con colistina y con la difusión con discos que presenta discrepancias muy importantes o errores muy graves en el 32% de los casos. También para tigeciclina se produjeron discrepancias menores con difusión con discos (14%), Etest (26%) y el sistema de microdilución Vitek 2 Compact System (24%).

En las tablas 7 y 8 referidas a los restantes BGNNF se observó una alta concordancia tanto para método como para agente antimicrobiano.

### Discusión

La determinación de la sensibilidad de los BGNNF a los diferentes agentes antimicrobianos presenta dificultades en muchas ocasiones, ya que el método de difusión con discos, habitual en la práctica diaria, puede resultar inadecuado y poco reproducible<sup>8,14</sup>. Los métodos de dilución en agar y de microdilución en caldo son los recomendables para estos microorganismos, pero resultan laboriosos y se hacen impracticables para la rutina habitual<sup>10,15</sup>. En los últimos años, se ha intentado establecer el Etest y los sistemas automatizados como alternativas seguras y relativamente sencillas, pero su aplicación a los BGNNF ha sido controvertida en distintos casos<sup>6,8,10</sup>.

En esta serie, y desde el punto de vista de los diferentes microorganismos estudiados, las cepas de *Acinetobacter* spp. son las que ofrecen resultados más reproducibles con las 3 técnicas comparadas, siendo las discrepancias muy importantes o los errores muy graves con respecto al método de referencia escasos para estos microorganismos. En este sentido, una reciente propuesta de modificación de los puntos de corte para tigeciclina minimizaría aún más el riesgo de errores graves<sup>16</sup>.

**Tabla 2**

Número de aislados y porcentajes de concordancia y de discrepancias entre el método de referencia mediante dilución en agar y otros 3 métodos para la determinación de la sensibilidad de 85 cepas de *Acinetobacter* spp. a 7 agentes antimicrobianos

Antibióticos	Concordancia, n (%)	Discrepancia muy importante, n (%)	Discrepancia importante, n (%)	Discrepancia menor, n (%)
Piperacilina-tazobactam				
Difusión con discos	79 (92,9)	–	–	6 (7,1)
Etest	80 (94,1)	–	–	5 (5,9)
VITEK 2 Compact System	75 (98,2)	–	–	10 (11,8)
Ceftazidima				
Difusión con discos	81 (95,3)	–	1 (1,2)	3 (3,5)
Etest	82 (96,5)	–	1 (1,2)	2 (2,4)
VITEK 2 Compact System	84 (98,8)	–	–	1 (1,2)
Imipenem				
Difusión con discos	85 (100)	–	–	–
Etest	85 (100)	–	–	–
VITEK 2 Compact System	85 (100)	–	–	–
Gentamicina				
Difusión con discos	85 (100)	–	–	–
Etest	85 (100)	–	–	–
VITEK 2 Compact System	85 (100)	–	–	–
Ciprofloxacino				
Difusión con discos	85 (100)	–	–	–
Etest	85 (100)	–	–	–
VITEK 2 Compact System	85 (100)	–	–	–
Colistina				
Difusión con discos	83 (97,6)	2 (2,4)	–	–
Etest	84 (98,8)	–	–	1 (1,2)
VITEK 2 Compact System	NT	NT	NT	NT
Tigeciclina				
Difusión con discos	84 (98,8)	–	–	1 (1,2)
Etest	69 (81,2)	–	–	16 (18,8)
VITEK 2 Compact System	75 (88,2)	–	–	10 (11,8)

NT: No testado.

**Tabla 3**

Sensibilidad in vitro de 80 aislamientos de *Stenotrophomonas maltophilia* a 7 agentes antimicrobianos mediante dilución en agar

Antibiótico	Rango	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Cepas sensibles, n (%)	Cepas intermedias, n (%)	Cepas resistentes, n (%)
Piperacilina-tazobactam	≤4–≥128	≥128	≥128	6 (7,5)	8 (10)	66 (82,5)
Ceftazidima	≤2–≥32	≥32	≥32	27 (33,75)	9 (11,25)	44 (55)
Imipenem	≥32	≥32	≥32	0	0	80 (100)
Gentamicina	≤1–≥32	16	≥32	19 (23,75)	14 (17,5)	47 (58,85)
Ciprofloxacino	≤0,25–≥8	1	≥8	40 (50)	10 (12,5)	30 (37,5)
Colistina	≤0,25–≥64	16	≥64	10 (12,5)	9 (11,25)	61 (70,25)
Tigeciclina	≤0,12–8	2	4	65 (81,25)	12 (15)	3 (3,75)

CMI: concentración mínima inhibitoria.

No obstante, se dan porcentajes elevados de discrepancias menores o de errores menores con Etest para este antibiótico, aunque al no haber puntos de corte bien establecidos (la FDA considera como sensibles cepas con CMI ≤2 mg/l, como intermedias con valores de 4 mg/l y como resistentes con valores de ≥8 mg/l, mientras que la European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing interpreta como sensibles valores ≤1 mg/l y como resistentes valores ≥2 mg/l) y al variar la reproducibilidad de los resultados según la composición del medio empleado<sup>17</sup>, estas discrepancias menores o errores menores pueden tener importancia en algunos casos.

Los resultados con *S. maltophilia* son preocupantes por la baja concordancia exhibida respecto al método de referencia. Con este microorganismo se obtiene una inaceptable proporción de discrepancias muy importantes o de errores muy graves para piperacilina-tazobactam con difusión con discos y VITEK 2 Compact System, ceftazidima con VITEK 2 Compact System y colistina con difusión con discos, lo que confirma resultados previos, siendo, sin embargo, el Etest una alternativa válida para este microorganismo<sup>10</sup>. Igual que para *Acinetobacter* spp., se obtuvieron discrepancias menores o errores menores entre el 15 y el 20% de las cepas con el sistema de microdilución VITEK 2 Compact System y Etest para tigeciclina, cuyos puntos de corte, al

**Tabla 4**

Número de aislados y porcentajes de concordancia y de discrepancias entre el método de referencia mediante dilución en agar y otros 3 métodos para la determinación de la sensibilidad de 80 cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* a 7 agentes antimicrobianos

Antibióticos	Concordancia, n (%)	Discrepancia muy importante, n (%)	Discrepancia importante, n (%)	Discrepancia menor, n (%)
Piperacilina-tazobactam				
Difusión con discos	62 (77,5)	12 (15,0)	–	6 (7,5)
Etest	78 (97,5)	–	–	2 (2,5)
VITEK 2 Compact System	32 (40,0)	17 (21,3)	2 (2,5)	29 (36,3)
Ceftazidima				
Difusión con discos	74 (92,5)	2 (2,5)	1 (1,3)	3 (3,8)
Etest	78 (97,5)	–	–	2 (2,5)
VITEK 2 Compact System	67 (83,8)	7 (8,8)	2 (2,5)	4 (5,0)
Imipenem				
Difusión con discos	80 (100)	–	–	–
Etest	80 (100)	–	–	–
VITEK 2 Compact System	77 (96,3)	3 (3,8)	–	–
Gentamicina				
Difusión con discos	75 (93,7)	–	1 (1,3)	4 (5)
Etest	79 (98,7)	1 (1,25)	–	–
VITEK 2 Compact System	62 (77,5)	–	1 (1,3)	17 (21,23)
Ciprofloxacino				
Difusión con discos	75 (93,7)	1 (1,3)	1 (1,3)	3 (3,8)
Etest	68 (85,0)	3 (3,8)	–	9 (11,3)
VITEK 2 Compact System	59 (73,7)	2 (2,5)	6 (7,5)	13 (16,3)
Colistina				
Difusión con discos	38 (47,5)	40 (50,0)	–	2 (2,5)
Etest	77 (96,3)	–	–	3 (3,8)
VITEK 2 Compact System	NT	NT	NT	NT
Tigeciclina				
Difusión con discos	73 (91,3)	3 (3,8)	–	4 (5,0)
Etest	64 (80)	–	–	16 (20,0)
VITEK 2 Compact System	61 (76,3)	–	7 (8,8)	12 (15,0)

NT: No testado.

**Tabla 5**

Sensibilidad in vitro de 50 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* a 7 agentes antimicrobianos mediante dilución en agar

Antibiótico	Rango	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Cepas sensibles, n (%)	Cepas intermedias, n (%)	Cepas resistentes, n (%)
Piperacilina-tazobactam	<4-≥128	64	≥128	26 (52)	–	28 (48)
Ceftazidima	≤2-≥32	4	≥32	27 (54)	5 (10)	18 (36)
Imipenem	≤1-≥32	8	≥32	24 (48)	1 (2)	25 (50)
Gentamicina	≤1-≥32	≤1	4	40 (80)	6 (12)	4 (8)
Ciprofloxacino	≤0,25-≥8	≤0,25	2	5 (10)	2 (4)	43 (86)
Colistina	1-≥64	4	8	24 (48)	6 (12)	20 (40)
Tigeciclina	2-≥32	8	16	1 (2)	14 (28)	35 (70)

CMI: concentración mínima inhibitoria.

igual que para *Acinetobacter* spp., no se aceptan de forma definitiva.

Respecto a *P. aeruginosa*, el resultado de un 32% de discrepancias muy importantes o de errores muy graves con difusión con discos para colistina debería llevar en la práctica al abandono de este método para este antibiótico. Además, se debe tener en cuenta que ninguna de las 50 cepas estudiadas mostró un fenotipo mucoide que pudiera desvirtuar los resultados obtenidos. De nuevo se repitieron en la serie los elevados porcentajes de discrepancias menores o de errores menores con Etest y VITEK 2 Compact System para tigeciclina, aunque para este microorganismo este hecho no debe, en principio, tener repercusión dada la escasa actividad intrínseca del agente antimicrobiano.

Los restantes BGNNF mostraron una buena correlación entre el método de referencia y cualquiera de los otros 3 métodos para todos los antibióticos, salvo gentamicina y VITEK 2 Compact System, aunque el escaso número de cepas estudiadas limita estas conclusiones.

Por tanto, los resultados obtenidos en la experiencia de los autores indican que el método de difusión con discos resulta inaceptable para *S. maltophilia*, con casi la mitad de las cepas con discrepancias muy importantes o errores muy graves cuando se aplicaba a este microorganismo y colistina. También hubo un alto porcentaje de errores muy graves para este microorganismo y piperacilina-tazobactam. Igualmente el método era claramente inválido para colistina y *P. aeruginosa*, entre las que una de cada 3

**Tabla 6**

Número de aislados y porcentajes de concordancia y de discrepancias entre el método de referencia mediante dilución en agar y otros 3 métodos para la determinación de la sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a 7 agentes antimicrobianos

Antibióticos	Concordancia, n (%)	Discrepancia muy importante, n (%)	Discrepancia importante, n (%)	Discrepancia menor, n (%)
Piperacilina-tazobactam				
Difusión con discos	47 (94,0)	1 (2,0)	–	2 (4,0)
Etest	50 (100)	–	–	–
VITEK 2 Compact System	45 (90,0)	4 (8,0)	–	1 (2,0)
Ceftazidima				
Difusión con discos	48 (96,0)	–	–	2 (4,0)
Etest	50 (100)	–	–	–
VITEK 2 Compact System	48 (96,0)	1 (2,0)	–	1 (2,0)
Imipenem				
Difusión con discos	50 (100)	–	–	–
Etest	50 (100)	–	–	–
VITEK 2 Compact System	50 (100)	–	–	–
Gentamicina				
Difusión con discos	47 (94,0)	–	1 (2,0)	2 (4,0)
Etest	49 (98,0)	–	1 (2,0)	0
VITEK 2 Compact System	45 (90,0)	–	1 (2,0)	4 (8,0)
Ciprofloxacino				
Difusión con discos	48 (96,0)	–	1 (2,0)	1 (2,0)
Etest	49 (98,0)	–	–	1 (2,0)
VITEK 2 Compact System	43 (86,0)	–	–	7 (14,0)
Colistina				
Difusión con discos	31 (62,0)	16 (32,0)	–	3 (6,0)
Etest	43 (86,0)	–	1 (2,0)	6 (12,0)
VITEK 2 Compact System	NT	NT	NT	NT
Tigeciclina				
Difusión con discos	42 (84,0)	–	1 (2,0)	7 (14,0)
Etest	37 (74,0)	–	–	13 (26,0)
VITEK 2 Compact System	37 (74,0)	–	1 (2,0)	12 (24,0)

NT: No testado.

**Tabla 7**

Sensibilidad in vitro de 13 aislamientos de otros bacilos gramnegativos no fermentadores (8 cepas de *Ralstonia pickettii* y 5 cepas de *Burkholderia cepacia*) a 7 agentes antimicrobianos mediante dilución en agar

Antibiótico	Rango	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Cepas sensibles, n (%)	Cepas intermedias, n (%)	Cepas resistentes, n (%)
Piperacilina-tazobactam	<4–≥128	8	≥128	9 (69,3)	0	4 (30,7)
Ceftazidima	<2–≥32	4	≥32	9 (69,3)	0	4 (30,7)
Imipenem	<1–≥32	≤1	≥32	10 (77)	0	3 (23)
Gentamicina	<1–≥32	4	≥32	3 (23)	5 (38,5)	5 (38,5)
Ciprofloxacino	≤0,25–≥8	≤0,25	4	10 (77)	1 (7,6)	2 (15,4)
Colistina	0,5–≥64	32	≥64	3 (23)	2 (15,4)	8 (61,6)
Tigeciclina	≤0,12–16	0,5	8	10 (77)	0	3 (23)

CMI: concentración mínima inhibitoria.

cepas exhibía desacuerdos muy importantes respecto al método de referencia.

El problema más importante observado cuando se utilizó el sistema automático VITEK 2 Compact System fueron los resultados referidos a *S. maltophilia* con piperacilina-tazobactam, ceftazidima y tigeciclina, claramente inválidos en estos casos, que alcanzaron porcentajes inaceptables de discrepancias muy importantes o de errores muy graves y se necesitó, por tanto, en ambas situaciones su validación con un método de referencia. Para el resto de los microorganismos y agentes antimicrobianos estudiados la mayor parte de los desacuerdos observados, aunque fueron numerosos, se catalogaron como leves, por lo que se cree que el sistema necesita claramente mejorar en estos aspectos.

En conjunto, el Etest mostró una buena correlación con el método de referencia, lo que confirmó resultados previos que mostraban que el gradiente de difusión era una alternativa válida para la determinación de la sensibilidad de la mayor parte de estos microorganismos<sup>10,15</sup>, ya que el alto número de discrepancias menores o errores menores puede venir condicionado por los diferentes puntos de corte considerados y la diferente composición del medio utilizado. Si se tiene presente lo anterior, se puede concluir que el Etest resulta un método válido para la interpretación de resultados para *P. aeruginosa* y para cualquiera de los agentes antimicrobianos estudiados, mientras que para *Acinetobacter* spp. y especialmente para *S. maltophilia* los resultados con tigeciclina no ofrecen una fiabilidad absoluta, lo

**Tabla 8**

Número de aislados y porcentajes de concordancia y de discrepancias entre el método de referencia de dilución en agar y otros 3 métodos para la determinación de la sensibilidad de 13 aislados de bacilos gramnegativos no fermentadores a 7 agentes antimicrobianos

Antibióticos	Concordancia, n (%)	Discrepancia muy importante, n (%)	Discrepancia importante, n (%)	Discrepancia menor, n (%)
<b>Piperacilina-tazobactam</b>				
Difusión con discos	13 (100)	–	–	–
Etest	13 (100)	–	–	–
VITEK 2 Compact System	13 (100)	–	–	–
<b>Ceftazidima</b>				
Difusión con discos	13 (100)	–	–	–
Etest	13 (100)	–	–	–
VITEK 2 Compact System	13 (100)	–	–	–
<b>Imipenem</b>				
Difusión con discos	13 (100)	–	–	–
Etest	13 (100)	–	–	–
VITEK 2 Compact System	13 (100)	–	–	–
<b>Gentamicina</b>				
Difusión con discos	13 (100)	–	–	–
Etest	13 (100)	–	–	–
VITEK 2 Compact System	11 (84,6)	–	–	2 (15,4)
<b>Ciprofloxacinao</b>				
Difusión con discos	13 (100)	–	–	–
Etest	13 (100)	–	–	–
VITEK 2 Compact System	13 (100)	–	–	–
<b>Colistina</b>				
Difusión con discos	11 (84,6)	1 (7,7)	–	1 (7,7)
Etest	12 (92,3)	–	–	1 (7,7)
VITEK 2 Compact System	NT	NT	NT	NT
<b>Tigeciclina</b>				
Difusión con discos	13 (100)	–	–	–
Etest	13 (100)	–	–	–
VITEK 2 Compact System	13 (100)	–	–	–

NT: No testado.

que se debe confirmar con un método de referencia en caso de ser necesario.

## Bibliografía

- Schreckenberger PC, Daneshvar MI, Weyant RS, Hollis DG. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other non-fermentative gram-negative rods. In: Murray R, Baron EJ, Jorgensen H, Pfaller MA, Yolken RH, editores. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington, DC: ASM Press; 2003. p. 49–79.
- Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect. 2005;11:868–73.
- Akova M, Bonfiglio G, Livermore DM. Susceptibility to beta-lactam antibiotics of mutant strains of *Xanthomonas maltophilia* with high-and low-level constitutive expression of L1 and L2 beta-lactamases. J Med Microbiol. 1991;35:208–13.
- Jones RN. Global epidemiology of antimicrobial resistance among community-acquired and nosocomial pathogens: A five year summary from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2001). Semin Respir Crit Care Med. 2003;24:121–34.
- Ferrara AM. Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. Int J Antimicrob Agents. 2006;27:183–95.
- Hohl P, Frei R, Aubry P. In vitro susceptibility of 33 clinical case isolates of *Xanthomonas maltophilia*. Inconsistent correlation of agar dilution and of disk diffusion test results. Diagn Microbiol Infect Dis. 1991;14:447–50.
- Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: Review of available interpretive criteria and quality control guidelines. J Clin Microbiol. 2001;39:183–90.
- Pankuch GA, Jacobs MR, Rittenhouse SF, Appelbaum PC. Susceptibilities of 123 strains of *Xanthomonas maltophilia* to eight beta-lactams (including beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations) and ciprofloxacin tested by five methods. Antimicrob Agents Chemother. 1994;38:2317–32.
- Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev. 1996;9:148–65.
- Yao JDC, Louie M, Louie L, et al. Comparison of E test and agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. J Clin Microbiol. 1995;33:1428–30.
- Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Protocolo número 11. 2000. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Disponible en: URL: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. CLSI document M100-S17 [ISBN 1-56238-625-5]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.
- Thornsberry C, Gavan TL. Automated procedures for antimicrobial susceptibility tests. In: Lennette EH, Balows AL, Hausler Jr WJ, Truant JP, editores. Manual of Clinical Microbiology. 3th ed. Washington, DC: ASM Press; 1980. p. 491–4.
- Arpi M, Alan Victor MA, Mortensen I, Gottschau A, Bruun B. In vitro susceptibility of 124 *Xanthomonas maltophilia* (*Stenotrophomonas maltophilia*) isolates. APMIS. 1996;104:108–14.
- Arroyo LA, García-Curiel A, Pachón-Ibáñez ME, Llanos AC, Ruiz M, Pachón J, et al. Reliability of the Etest method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2006;43:903–5.
- Jones RN, Ferraro MJ, Reller LB, Schreckenberger PC, Swenson JM, Saderet HS. Multicenter studies of tigecycline disk diffusion susceptibility results for *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. 2007;45:227–30.
- Bradford PA, Petersen PJ, Young MC, Jones H, Tischler M, O'Connell J. Tigecycline MIC testing by broth dilution requires use of fresh medium or addition of the biocatalytic oxygen-reducing reagent oxyrase to standardize the test method. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(9):3903–9.