



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Valoración de 2 técnicas automatizadas de microdilución frente a dilución en agar en la determinación de la sensibilidad a fosfomicina en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos



Yolanda Gil-Romero^a, Marta Regodón-Domínguez^a, Isabel Wilhelmi de Cal^b, Fátima López-Fabal^a y José Luis Gómez-Garcés^{a,*}

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

^b Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Severo Ochoa, Leganés, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 2 de junio de 2015

Aceptado el 30 de septiembre de 2015

On-line el 25 de noviembre de 2015

Palabras clave:

Sensibilidad

Fosfomicina

Pseudomonas aeruginosa

R E S U M E N

Los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos se producen cada vez con más frecuencia, haciendo conveniente establecer tratamientos combinados de los que fosfomicina puede formar parte. Los criterios para establecer la sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a fosfomicina han sido aprobados utilizando un método de dilución en agar. Sin embargo, los sistemas de microdilución comercializados son los más utilizados en la práctica diaria. Los resultados de este estudio indican que estos métodos resultan aceptables cuando se quiera conocer el comportamiento de estos microorganismos frente a fosfomicina.

© 2016 Publicado por Elsevier España, S.L.U.

Assessment of 2 automated microdilution techniques compared to an agar dilution method in determining sensitivity to fosfomicin in strains of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

A B S T R A C T

Carbapenems-resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates has been widely reported. Fosfomicin has been shown to act synergistically with other antimicrobials. The agar dilution method was approved for susceptibility testing for fosfomicin and *Pseudomonas aeruginosa*. However, broth microdilution methods are the basis of systems currently used in clinical microbiology laboratories. The results of this study indicate that these methods are acceptable as susceptibility testing methods for fosfomicin against these organisms.

© 2016 Published by Elsevier España, S.L.U.

Keywords:

Susceptibility

Fosfomicin

Pseudomonas aeruginosa

Introducción y objetivos

Los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* con patrones de resistencia a los antipseudomónicos habituales, y especialmente a los carbapenémicos, aumentan progresivamente, limitando las opciones terapéuticas en las infecciones en las que este

microorganismo toma parte^{1,2}. Fosfomicina (FO) es un antimicrobiano conocido desde hace décadas que puede actuar de forma sinérgica con otros antimicrobianos, por lo que su discreta actividad antipseudomónica de forma individual puede potenciarse con diferentes combinaciones a la hora de diseñar distintos tratamientos en estas desfavorables situaciones^{3,4}.

Los criterios para establecer la sensibilidad a FO han sido aprobados mediante dilución en agar⁵, aunque no establecen puntos de corte para de *Pseudomonas aeruginosa*. No existe, por otra parte, una aceptación en la utilización de otros métodos como la microdilución

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jlgarcés@microb.net (J.L. Gómez-Garcés).

automatizada que, por otra parte, es la técnica de determinación de sensibilidad antimicrobiana mayoritariamente utilizada en los laboratorios de microbiología. Además, en la actualidad, la existencia de diferentes equipos comerciales disponibles hace aún más azarosa esta determinación.

El objetivo de este estudio es la valoración de la actividad de FO frente a aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos (PARC) mediante 2 sistemas comerciales de microdilución, comparándola con la obtenida por dilución en agar, considerando este último como método de referencia.

Material y métodos

Se estudiaron un total de 104 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de otros tantos pacientes que presentaban distintos patrones de sensibilidad frente a distintos antipseudomónicos, aunque todas ellas eran resistentes a imipenem y/o meropenem ($\text{CMI} \geq 8 \text{ mg/l}$).

La sensibilidad a FO se llevó a cabo mediante dilución en agar Müller-Hinton con concentraciones crecientes del antimicrobiano, definiéndose la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la concentración más baja del antimicrobiano capaz de inhibir completamente el crecimiento del microorganismo en la placa⁵. De forma paralela, se realizaron 2 sistemas automatizados de microdilución utilizando: 1) la tarjeta AST-248 (VITEK-2, Biomerieux, Francia); y 2) el panel MicroScan Walk-Away Gram-negative, NUC59 (Beckman, Ca, EE. UU.). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 se utilizó como cepa control.

Se consideraron los resultados como:

Acuerdo esencial cuando los valores de CMI obtenidos entre el método de referencia y cada uno de los 2 métodos de microdilución fueron iguales o a lo sumo con diferencias de ± 1 dilución, siempre que esta diferencia no afectara a su categorización como sensible o no sensible.

Acuerdo de categoría cuando estos valores permitían situarlos en la misma categoría, utilizando los valores *cutoff* epidemiológicos ($\leq 128 \text{ mg/l}$) definidos por EUCAST⁶.

Se definieron como errores máximos los valores de CMI obtenidos por microdilución cuando se categorizaban como sensibles, mientras que el agar-dilución los consideraba no sensibles.

Se definieron como errores mayores cuando los resultados obtenidos por microdilución se categorizaban como resistentes, mientras que el método de referencia los consideraba sensibles.

Al no poder disponer de categoría intermedia, ya que utilizamos un ECOFF como punto de corte, no se pudieron determinar los errores menores.

Los niveles de concordancia se acompañaron de los correspondientes intervalos de confianza. Se determinó el coeficiente kappa para valorar el grado de concordancia entre los diferentes métodos.

Resultados

Utilizando el método de referencia, la CMI de FO era $\leq 128 \text{ mg/l}$ en 84 cepas (80,7%) del total de 104 cepas estudiadas, mientras que para las otras 20 cepas la CMI de FO era superior a 128 mg/l (19,3%). La CMI_{90} era de 256 mg/l , mientras que la CMI_{50} y el valor modal de la serie fue de 64 mg/l (tabla 1). Utilizando los 2 métodos de microdilución las cepas sensibles fueron 82 (78,8%) para el método 1 y 80 (76,9%) para el método 2. Las CMI_{90} , CMI_{50} y los valores modales de ambas técnicas de microdilución fueron los mismos que los hallados con el método de referencia.

Existió un acuerdo esencial entre la dilución en agar y el método 1 de microdilución del 76,9%, y entre dilución en agar y el método 2 del 80,7%, siendo los valores de κ de 0,64 y 0,65 respectivamente, indicativos de concordancia considerable para ambas

Tabla 1

Porcentajes de sensibilidad a fosfomicina según los métodos empleados en 104 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

	Agar dilución	Microdilución 1	Microdilución 2
$\text{CMI} \leq 128 \mu\text{g/ml}$	84 (80,7%)	82 (78,8%)	80 (76,9%)
$\text{CMI} > 128 \mu\text{g/ml}$	20 (19,3%)	22 (21,1%)	24 (23,1%)

Valor EUCAST ECOFF $\leq 128 \text{ mg/l}$.

comparaciones. El acuerdo en la valoración de categoría de los resultados fue del 88,4%, idéntico para ambas comparaciones, y los errores máximos totales se limitaron a 2 cepas para el método 1 y a 4 para el método 2. Los errores mayores aparecieron en 3 cepas para el método 1 y en 7 para el método 2. Estos mismos errores máximos y mayores se repitieron cuando se valoraban solo en cepas no sensibles los primeros y solo en cepas sensibles los segundos. Al no existir categoría intermedia no pudieron calcularse los errores menores, pero los resultados de ambas técnicas, valores de referencia versus valores del método a evaluar, no diferían en más de una dilución y sin afectar la interpretación del resultado en 3 cepas para el método 1 y en 7 cepas para el método 2 (tabla 2).

Discusión

En nuestra serie el porcentaje de cepas sensibles según el valor ECOFF⁵ de EUCAST fue superior al 80% (80,7%) cuando utilizamos el método de dilución en agar, y este porcentaje solo fue levemente inferior al emplear cualquiera de los 2 métodos de microdilución (78,8% y 76,9%), existiendo por tanto un acuerdo sustancial en la valoración de la mayoría de las cepas con cualquiera de las 3 opciones planteadas. Este acuerdo en la categorización de cepas consideradas como no resistentes, más aquellas otras incluidas como resistentes, alcanzó porcentajes muy próximos o superiores al 90% en la comparación de ambos métodos con el de referencia (95,1% y 89,4%). Tanto los valores modales en la serie, como las CMI_{90} , CMI_{50} fueron iguales con las 3 herramientas, por lo que en un principio podrían considerarse igualmente válidas. Además, existió un acuerdo esencial en los valores obtenidos para la CMI del antimicrobiano entre la dilución en agar y el método 1 de microdilución en 80 cepas y entre el método de referencia y el método 2 de microdilución en 84, indicativos de «concordancia considerable» al utilizar los valores κ en ambas comparaciones. Otro aspecto relevante fue el escaso número de errores máximos observados en la comparación, donde solo 2 cepas podrían haberse considerado como sensibles si utilizáramos el método 1 y 4 si empleáramos el método 2. Estos datos tienen mayor relevancia si tenemos en cuenta que una gran parte de las cepas se movían en un rango próximo al ECOFF, por

Tabla 2

Correlación entre los 2 métodos de microdilución y el método de referencia de agar dilución

	Agar dilución y microdilución 1 ^a Porcentaje de correlación (n.º aislamientos/n.º total cepas)	Agar dilución y microdilución 2 ^b Porcentaje de correlación (n.º aislamientos/n.º total cepas)
Acuerdo esencial	76,9 (80/104)	80,7 (84/104)
Acuerdo en la categoría ^c	95,1 (99/104)	89,4 (93/104)
Errores máximos totales	1,9 (2/104)	3,8 (4/104)
Errores mayores totales	2,8 (3/104)	6,7 (7/104)

^a AST-248. VITEK-2.

^b MicroScan.

^c Valor EUCAST ECOFF $\leq 128 \text{ mg/l}$ para la categorización.

lo que una dilución arriba o abajo podía significar su adscripción a una u otra categoría.

Teniendo en cuenta que los equipos de microdilución comercializados en nuestro ámbito, entre los que se encuentran de manera preeminente los 2 aquí estudiados, son con diferencia los más utilizados en los laboratorios de microbiología clínica, los resultados de este estudio vienen a corroborar que, al igual que la microdilución en caldo no automatizada⁷, constituyen también una alternativa fiable a la hora de conocer la CMI de FO en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, incluyendo aquellas cepas con patrones de alta resistencia a carbapenémicos, donde asociaciones que incluyan a FO constituyen alternativas terapéuticas valorables^{8,9}, a diferencia de otras herramientas como la difusión en gradiente, que no parece garantizar una concordancia adecuada con el hasta ahora método de referencia de la dilución en agar⁷.

Por tanto, y como conclusión, podemos señalar que los valores de CIM de FO frente a *Pseudomonas aeruginosa* utilizando tarjetas o paneles de microdilución comerciales ofrecen resultados aceptables que los hacen fácilmente incorporables a la actividad de la rutina del laboratorio cuando se quiera conocer el comportamiento de estos microorganismos frente a FO.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Korvick JA, Yu VL. Antimicrobial agent therapy for *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agent Chemother.* 1991;35:2167–72.
2. García-Castillo M, Campo R, Morosini MI, Riera E, Cabot G, Willems R, et al. Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2905–10.
3. Maviglia R, Nestorini R, Pennisi M. Role of old antibiotics in multidrug resistant bacterial infection. *Curr Drug Targets.* 2009;10:895–905.
4. Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Falagas ME. Synergy of fosfomicin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:695–701.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 25th informational supplement. M100-S2. 2015. CLSI, Wayne, PA.
6. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, 2013. Disponible en: <http://www.eucast.org>
7. Díez-Aguilar M, Morosini MI, Campo R, García-Castillo M, Zamora J, Canton R. In vitro activity of fosfomicin against a collection of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 16 Spanish hospitals: Establishing the validity of standard broth microdilution as susceptibility testing method. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2013;57:5701–73.
8. Yamada S, Hyo Y, Ohmori S, Ohuchi M. Role of ciprofloxacin in its synergistic effect with fosfomicin on drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemother.* 2007;53:202–9.
9. Kastori A, Rafailidis P, Vouloumanou EK, Gkegkes ID, Falagas ME. Synergy of fosfomicin with other antibiotics for gram-positive and gram-negative bacteria. *Eur J Pharmacol.* 2010;66:359–68.