

Sensibilidad de *Acinetobacter* a la colistina evaluada mediante los métodos de predifusión y de concentración inhibitoria mínima. Detección de aislamientos heterorresistentes

MELINA E. HERRERA^{1*}, LILIANA N. MOBILIA^{1,2}, GRACIELA R. POSSE^{1,3}

¹Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Adventista del Plata. 25 de Mayo 99, (3103) Libertador San Martín, Entre Ríos.

²Laboratorio de Análisis Clínicos Dr. Domingo Nanni. Colón 122-128, (3100) Paraná, Entre Ríos. ³Laboratorio de Bacteriología, Sanatorio Adventista del Plata. 25 de Mayo 255, (3103) Libertador San Martín, Entre Ríos.

*Correspondencia. E-mail: invest5@uapar.edu

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar comparativamente los métodos de predifusión y de concentración inhibitoria mínima para establecer la sensibilidad de aislamientos del complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ABC) a la colistina y detectar a aquellos que presenten heterorresistencia a dicho antibiótico. Se estudiaron 75 aislamientos de ABC recuperados de materiales clínicamente significativos. Se determinó su sensibilidad a la colistina por el método de predifusión y de concentración inhibitoria mínima. Todos los aislamientos resultaron sensibles, con CIM ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ y halos de inhibición en el ensayo de la predifusión ≥ 20 mm. Mediante el método de eficiencia de plaqueo se evaluó la presencia de heterorresistencia a la colistina. Se encontraron 14 aislamientos que originaron colonias heterorresistentes; sus CIM aumentaron en algunos casos en más de 8 veces. Con estas colonias seleccionadas se repitió el ensayo de predifusión. Finalmente se confeccionaron los gráficos de dispersión y se realizaron los análisis de regresión lineal, tanto para el conjunto inicial de todos los aislamientos clínicos como para el subgrupo de los aislamientos resistentes generados durante la evaluación de la heterorresistencia. Se obtuvieron coeficientes de determinación (r^2) de 0,2017 y 0,604, respectivamente, lo que indica correlación entre los métodos sólo al evaluar aislamientos preseleccionados por su resistencia a este agente.

Palabras clave: *Acinetobacter*, predifusión, colistina, heterorresistencia

ABSTRACT

Comparative evaluation of the sensitivity of *Acinetobacter* to colistin, using the prediffusion and minimum inhibitory concentration methods. Detection of heteroresistant isolates. The objective of this study is to perform a comparative evaluation of the prediffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) methods for the detection of sensitivity to colistin, and to detect *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex* (ABC) heteroresistant isolates to colistin. We studied 75 isolates of ABC recovered from clinically significant samples obtained from various centers. Sensitivity to colistin was determined by prediffusion as well as by MIC. All the isolates were sensitive to colistin, with MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$. The results were analyzed by dispersion graph and linear regression analysis, revealing that the prediffusion method did not correlate with the MIC values for isolates sensitive to colistin ($r^2 = 0.2017$). Detection of heteroresistance to colistin was determined by plaque efficiency of all the isolates with the same initial MICs of 2, 1, and 0.5 $\mu\text{g/ml}$, which resulted in 14 of them with a greater than 8-fold increase in the MIC in some cases. When the sensitivity of these resistant colonies was determined by prediffusion, the resulting dispersion graph and linear regression analysis yielded an $r^2 = 0.604$, which revealed a correlation between the methodologies used.

Key words: *Acinetobacter*, prediffusion, colistin, heteroresistance

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter baumannii se ha convertido en los últimos años en uno de los agentes patógenos más comúnmente asociados con las infecciones nosocomiales y presenta un gran desafío terapéutico debido a su capacidad para adquirir determinantes de resistencia frente a la mayoría de los antimicrobianos (1, 4, 20, 26). En efecto, se están describiendo cada vez con mayor frecuencia brotes de infecciones nosocomiales graves producidas por organismos resistentes a casi todas las opciones terapéuticas disponibles (3, 6, 27). Si bien este

patógeno puede causar una amplia variedad de infecciones como bacteriemias, infecciones del tracto urinario y meningitis secundarias, principalmente está asociado a las neumonías en pacientes con asistencia ventilatoria mecánica (1).

Aunque el tratamiento de elección son los antibióticos pertenecientes a la familia de los carbapenemes, actualmente la resistencia en nuestro país es del 40-60 % en las unidades de terapia intensiva (23). Hay estudios que demuestran que en neumonías asociadas a ventilación mecánica causadas por *A. baumannii*, la colistina intravenosa resultó ser de una eficacia comparable a la del

imipenem (10, 14). De esta manera, la colistina surge como una opción terapéutica válida en estos casos (17).

La colistina es un antibiótico polipeptídico que corresponde a la familia de las polimixinas. Este antibiótico, descubierto en la década del 40, mostraba buena actividad frente a la mayoría de los bacilos gram negativos. Sin embargo, cerca de la década del 80 se dejó de usar, ya que se demostró una alta incidencia de nefrotoxicidad. A pesar de esto, la emergencia en todo el mundo de patógenos nosocomiales gram negativos resistentes a la mayoría de las opciones terapéuticas disponibles en la práctica clínica ha llevado a que la colistina sea una opción terapéutica válida para tratar a los pacientes con infecciones causadas por patógenos multirresistentes (7, 11, 13).

El método más usado rutinariamente para diagnosticar la sensibilidad a los antibióticos en los laboratorios de bacteriología es el antibiograma por difusión con discos (método de Kirby Bauer). Los antibióticos pertenecientes a la familia de las polimixinas se caracterizan por una pobre difusión en el agar debido a su elevado peso molecular, lo que lleva a resultados poco confiables (7, 13, 19). Es por esto que el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) no ha publicado hasta el momento los puntos de corte para la colistina (5). Por otra parte, los métodos de referencia como la determinación de la CIM, resultan muy laboriosos para su uso de rutina o muy costosos, como sucede en el caso de usar el método epsilométrico (Etest).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la utilidad del método de predifusión que ofrece la firma Rosco Diagnostica A/S (Dinamarca), para analizar la resistencia de aislamientos clínicos a la colistina. Este método no está difundido en la bibliografía, a pesar de que podría resultar una alternativa más sencilla que la determinación de la CIM en medio sólido (5, 8, 9, 16). Por otra parte, cabe destacar que en diversos estudios se ha demostrado la emergencia de heterorresistencia en aislamientos de *A. baumannii* sensibles a la colistina, lo cual es de suma importancia ya que esto podría llevar al rápido desarrollo de resistencia y por ende, a falla terapéutica (12,15, 24). Es por esto que también nos propusimos como objetivo la detección de aislamientos heterorresistentes a la colistina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un trabajo experimental prospectivo *in vitro*. Se estudiaron 75 aislamientos de *Acinetobacter* pertenecientes al complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ABC) provenientes de materiales clínicamente significativos, procedentes de pacientes asistidos en distintos centros (Sanatorio Adventista del Plata, Libertador San Martín, Entre Ríos; Laboratorio de Análisis Clínicos Domingo Nanni, Paraná, Entre Ríos y Hospital Cullen, Santa Fe). Los aislamientos fueron identificados fenotípicamente mediante pruebas bioquímicas (21) y almacenados por duplicado en tubos Eppendorf con caldo glicerol al 15 %, a -20 °C. Se determinó su sensibilidad a la colistina por el método de difusión, de predifusión y de CIM en medio sólido.

El método de predifusión se llevó a cabo colocando una tableta Neo-Sensitab de la colistina (Rosco Diagnostica A/S) sobre una placa no inoculada de agar Mueller Hinton (Laboratorios Britania, Argentina) (2, 18, 25). Luego de 2 h a temperatura ambiente, se retiró la tableta golpeando la placa por detrás y se mantuvo a temperatura ambiente durante otras 18 h. Pasado este tiempo, la placa fue hisopada con un inóculo de una turbidez de 0,5 en la escala de Mc Farland preparado en solución fisiológica estéril, e incubada durante 24 h a 35-37 °C. Finalmente, se midieron las zonas de inhibición teniendo en cuenta los puntos de corte propuestos por Rosco Diagnostica (≤ 10 mm, resistente; ≥ 15 mm, sensible). Se utilizó como control de calidad del proceso la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Esto se realizó tanto en los aislamientos de acuerdo con sus CIM, se consideraron sensibles, como en los aislamientos resistentes seleccionados luego de realizar el ensayo de eficiencia de plaqueo.

La determinación de la CIM de la colistina se realizó por el método de dilución en agar utilizando sulfato de colistina (Sigma Aldrich, EE.UU.), bajo normas previamente estandarizadas según las recomendaciones del CLSI. Las concentraciones seriadas que se emplearon fueron 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 y 16 μ g/ml. Para la inoculación de las placas se utilizó un multiinoculador de 25 agujas, que dispensa gotas de 1 μ l cada una, de modo que la concentración final alcanzada fue de 10^4 ufc/ml. Se utilizaron como cepas patrones *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Se tuvieron en cuenta los puntos de corte propuestos por el CLSI (S: ≤ 2 μ g/ml, R: ≥ 4 μ g/ml).

Los datos se analizaron con un gráfico de dispersión mediante análisis de regresión lineal (Microsoft Excel 2003). Un coeficiente de determinación $r^2 \geq 0,49$ se consideró indicativo de asociación.

Luego se realizó la detección de heterorresistencia a la colistina por el método de eficiencia de plaqueo (22) en todos los aislamientos de ABC. Estos tenían valores de CIM de 2, 1 y 0,5 μ g/ml. El citado método consiste en estudiar el crecimiento del aislamiento frente a un gradiente de concentración del antibiótico de interés en una sola placa. Para ello se procedió a colocar 10 ml de agar Mueller Hinton fundido a una temperatura de 45-50 °C y se dejó solidificar la placa de manera inclinada en un ángulo de alrededor de 20°. Posteriormente se colocó la placa en posición horizontal y se vertió igual cantidad de agar Mueller Hinton con colistina, a una concentración 2 veces superior a la CIM de ese aislamiento; de esta manera se creó un gradiente de concentración del antibiótico sobre la placa. Luego se sembró un inóculo ajustado a una turbidez de 0,5 en la escala de Mc Farland y se dejó incubar en estufa a 35 °C durante 24-48 h. El crecimiento observado fue un gradiente desde el sitio de menor concentración al sitio de mayor concentración de antibiótico. Se seleccionaron las colonias más próximas al sitio de mayor concentración de antibiótico y se volvió a determinar la CIM; como ya se indicó, también se volvió a ensayar el método de predifusión con estas colonias.

RESULTADOS

Predifusión

Todos los aislamientos fueron originalmente sensibles a la colistina, con halos de inhibición ≥ 20 mm. Cuando este método se ensayó sobre colonias resistentes a la colistina previamente seleccionadas por el método de eficiencia de plaqueo, se observó un marcado descenso en el diámetro de los halos de inhibición (Figura 1 y 2 y Tabla 1).

CIM

Todos los aislamientos resultaron sensibles a la colistina, con valores de CIM ≤ 2 μ g/ml (Figura 1); las CIM₉₀ y CIM₅₀ fueron iguales a 1 μ g/ml.

Tabla 1. CIM y halos de inhibición (método de predifusión) iniciales y finales de los aislamientos que originaron colonias heterorresistentes.

Aislamiento	CIM		Halo de inhibición (predifusión)	
	inicial (µg/ml)	final (µg/ml)	inicial (mm)	final (mm)
2774-05	2	≥ 16	25	0
14370	2	≥ 16	23	0
94339-06	1	≥ 16	23	0
24338-08	1	≥ 16	26	0
24200-08	1	8	24	11
83219	1	≥ 16	21	0
104909	1	≥ 16	22	0
349	1	8	24	18
10386	1	4	23	13
89533	0,5	≥ 16	26	0
92391	0,5	4	25	5
351	0,5	16	25	5
112	0,5	≥ 16	27	0
12461	0,5	16	24	5

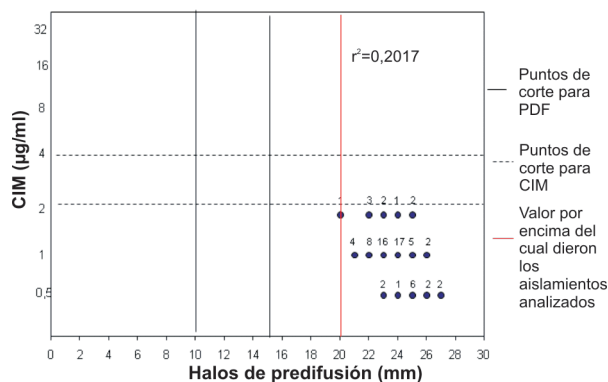


Figura 1. Escategrama que relaciona los valores determinados de CIM con los valores de los halos de predifusión (PDF) para los aislamientos parentales de ABC. Cada combinación “CIM-halo” obtenida experimentalmente está representada por un punto azul, donde el número por encima de éste representa la cantidad de aislamientos que mostraron dicha combinación. Nótese que con el método de predifusión todos los aislamientos evaluados resultaron sensibles, con halos de inhibición por encima de 20 mm, representado con una línea roja. Las líneas negras punteadas y continuas ilustran la zona comprendida entre los puntos de corte para CIM y predifusión, respectivamente.

Se realizaron los gráficos de dispersión y los correspondientes análisis de regresión lineal para comparar los dos métodos estudiados, tanto para el conjunto de todos los aislamientos (sensibles a colistina) evaluados al comienzo (Figura 1), como para los aislamientos resistentes seleccionados por el método de eficiencia de plaqueo (Figura 2). En el primer caso se obtuvo un coeficiente de determinación $r^2 = 0,2017$, mientras que en el segundo

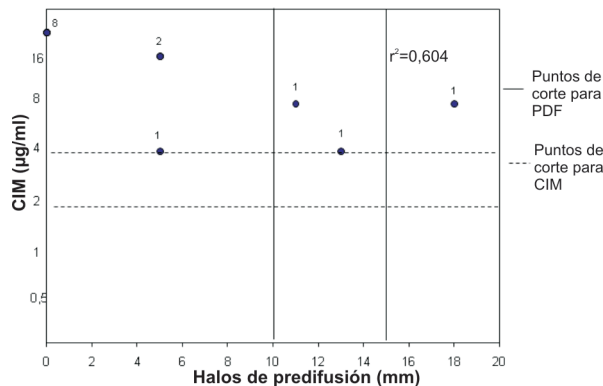


Figura 2. Escategrama que relaciona los valores determinados de CIM con los valores de los halos de predifusión (PDF) para las colonias seleccionadas de ABC resistentes a la colistina. Cada combinación “CIM-halo” obtenida experimentalmente está representada por un punto azul, donde el número por encima de éste representa la cantidad de aislamientos que mostraron dicha combinación. Las líneas negras punteadas y continuas ilustran la zona comprendida entre los puntos de corte para CIM y predifusión respectivamente.

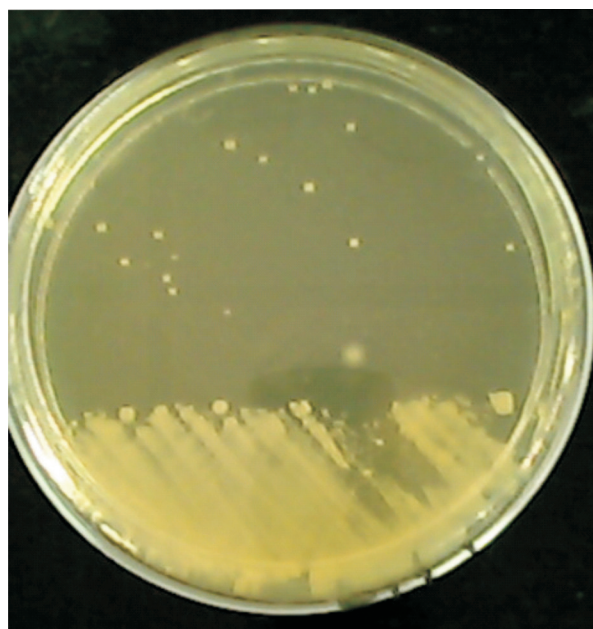


Figura 3. Método de eficiencia de plaqueo para detección de heterorresistencia. Nótese que se observan colonias aisladas en la zona de mayor concentración del antibiótico, las cuales resultaron resistentes a la colistina.

caso se obtuvo un $r^2 = 0,609$, lo que indica que no existió una relación de asociación entre los métodos cuando se utilizaron aislamientos que de acuerdo a sus CIM eran sensibles a la colistina, pero sí cuando se trabajó con aislamientos preseleccionados por ser resistentes a este agente.

Mientras que en el análisis inicial todos los aislamientos arrojaron CIM $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ y halos de predifusión ≥ 20 mm, la selección de colonias heterorresistentes condujo a casos de CIM $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ asociados a la ausencia de halo (Figura 2).

Detección de heterorresistencia

Catorce de los 75 aislamientos de ABC sometidos al procedimiento descrito mostraron ser heterorresistentes, ya que se seleccionaron colonias resistentes a la colistina (Figura 3). Dentro de estos se incluyeron 2 de los 9 aislamientos con CIM inicial de $2 \mu\text{g/ml}$, 7 de los 53 aislamientos con CIM inicial de $1 \mu\text{g/ml}$ y 5 de los 13 aislamientos con CIM inicial de $0,5 \mu\text{g/ml}$, con aumentos de CIM de más de 8 veces en algunos casos. Cuando estas colonias heterorresistentes fueron reevaluadas mediante el método de predifusión, se registró una marcada reducción en el diámetro de los halos de inhibición (Tabla 1).

DISCUSIÓN

La creciente emergencia de aislamientos de *A. baumannii* y otros importantes patógenos nosocomiales resistentes a la mayoría de los antibióticos utilizados en la práctica clínica (1, 4, 20) ha llevado al uso frecuente de la colistina, la que en muchos casos se presenta como única opción terapéutica eficaz (10). En este contexto, nos planteamos estudiar la utilidad del método de predifusión que ofrece Rosco Diagnostica A/S—muy poco divulgado en el ámbito científico (18, 25)—comparado con el método de referencia para determinar la sensibilidad de ABC a la colistina. La intención fue proponer una metodología confiable, fácil de aplicar y de bajo costo. Sin embargo, luego del análisis de los resultados, llegamos a la conclusión de que la predifusión no es un buen método para determinar la sensibilidad de ABC a la colistina, ya que no presentó correlación con la CIM cuando se estudió una población global no seleccionada de aislamientos clínicos. Por otra parte, hubo 3 aislamientos que generaron colonias resistentes de acuerdo a sus CIM que produjeron halos de 11 a 18 mm, que corresponden a la categoría de sensibles o con sensibilidad intermedia, lo que representaría la cifra inaceptable de 3,4 % de errores muy importantes (*very major errors*).

Debido a la emergencia cada vez más frecuente de heterorresistencia en aislamientos de *A. baumannii* (12, 15, 24), nos propusimos determinar si en alguno de los aislamientos clínicos evaluados se presentaba este fenómeno. En este sentido, es importante destacar que se obtuvieron aislamientos heterorresistentes independientemente del valor de CIM inicial, con aumentos de este parámetro de más de 8 veces en algunos casos. Esto sería indetectable utilizando solo la CIM para determinar la sensibilidad de ABC a la colistina, lo que resulta de marcada importancia ya que de no ser puesto en evidencia, este fenómeno podría llevar al fracaso terapéutico.

Agradecimientos: este trabajo se pudo realizar gracias a la subvención de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Adventista del Plata, Libertador San Martín, Entre Ríos, Argentina. También queremos expresar nuestro agradecimiento al Dr. Carlos Bantar por su valioso aporte.

BIBLIOGRAFÍA

- Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148-65.
- Borda N, Mari R, Tome G, Cocconi E, Morettin A, Limansky A, Cera G, Notario R, Fay F, Casellas JM, Bou Casals J. Comparación de los métodos de difusión, predifusión y epsilométrico en aislados de *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex frente a colistina. IV Actividad Científica Anual de la Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica. Encuentro SADI-SADEBAC, 2006, Resumen 16431, p. 82, Buenos Aires, Argentina.
- Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Querada C, Martínez-Beltrán J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases. J Clin Microbiol 2000; 38: 3299-05.
- Cisneros-Herreros JM, Garnacho-Montero J, Pachón-Ibañez ME. Nosocomial pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005; 23 suppl 3: 46-51.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 15th informational supplement, 2008; M100-S18 Vol. 28 N° 1: 45-6. Wayne, PA, EE.UU.
- Del Mar Tomas M, Cartelle M, Pertega S, Beceiro A, Llinares P, Canle D, Molina F, Villanueva R, Cisneros JM, Bou G. Hospital outbreak caused by a carbapenem-resistant strain of *Acinetobacter baumannii*: patient prognosis and risk-factors for colonization and infection. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 540-6.
- Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis 2005; 40: 1333-41.
- Galani I, Kontopidou F, Souli M, Rekatsina PD, Koratzanis E, Deliolanis J, Giamarellou H. Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. Int J Antimicrob Agents 2008; 31: 434-9.
- Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. J Clin Microbiol 2001; 39: 183-90.
- Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jiménez-Jiménez FJ, Barrero-Almodóvar AE, García-Garmendia JL, Bernabeu-Wittell M, Gallego-Lara SL, Madrazo-Osuna J. Treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia (VAP) with intravenous colistin: a comparison with imipenem-susceptible VAP. Clin Infect Dis 2003; 36: 1111-8.
- Gounden R, Bamford C, van Zyl-smit R, Cohen K, Maartens G. Safety and effectiveness of colistin compared with tobramycin for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* infections. BMC Infect Dis 2009; 9:26.
- Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH. Colistin heteroresistance in *Acinetobacter baumannii* with previous colistin therapy. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 351-2.
- Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. Clin Microbiol Rev 2008; 21: 449-65.
- Levin AS, Barone AA, Penco J, Santos MV, Marinho IS, Arruda EAG, Manrique EI, Costa SF. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Clin Infect Dis 2002; 35: 901-2.

15. 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.
16. Lo-Ten Foe JR, de Smet AMGA, Diederer BMW, Kluytmans JAJW, van Keulen PHJ. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, Etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3726-30.
17. Mukhopadhyay C, Krishna S, Vandana KE, Shenoy S, Bairy I. Ventilator-associated pneumonia with col-s strains: a successful comeback of colistin! *Braz J Infect Dis* 2008; 12: 444-6.
18. Nielsen SV, Casals JB. Detection of decreased susceptibility to glycopeptides in *S. aureus* using tablet (disc) prediffusion. 15th Eur Cong Microbiol Inf Dis (ECCMID) 2005.
19. Rodríguez CH, Pautaso J, Bombicino K, Vay C, Famiglietti A. Sensibilidad a colistín: evaluación de los puntos de corte disponibles en el antibiograma por difusión. *Rev Argent Microbiol* 2004; 36: 125-9.
20. Schell C, Posse G, Mobilia L, Limansky A, Bantar C. Comparative time-kill study of doxycycline, tigecycline, sulbactam, and imipenem against several clones of *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 61: 309-14.
21. Schreckenberger PC, Lindquist D. Algorithms for identification of aerobic gram-negative bacteria. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White O, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th edition. Washington D.C., ASM Press, 2007, p.371-6.
22. Sherris JC, Minshew BH. Mutational Antibiotic Resistance. En: Lorian V, chapter 14, 4th edition. Baltimore, 1996, p 418-31.
23. Sistema informático de Resistencia. <http://www.aam.org.ar/>
24. Tan CH, Li J, Nation RL. Activity of colistin against heteroresistant *Acinetobacter baumannii* and emergence of resistance in an *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3413-5.
25. User's Guide Neo-sensitabs susceptibility testing, Rosco Diagnostica A/S, 19th Ed, 2007-2008, p 18.
26. Vila J, Pachón J. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9: 587-99.
27. Wroblewska MM, Towner KJ, Marchel H, Luczak M. Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary-care hospital in Poland. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 490-6.