

Trabajo completo

Investigación de *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia y hetero-intermedia a vancomicina: metodología fácil y accesible para los laboratorios de microbiología clínica

RECIBIDO: 24/07/2012

ACEPTADO: 30/08/2012

Allignani, LC.² • Mollerach, A.^{1,2} • Nagel, A.^{1,2} • Bodrone, R.² • Ramirez, R.² • Mendosa, MA.¹ • Méndez, E. de los A.^{1,2}

¹Hospital Dr. José María Cullen. Av. Freyre 2150. Santa Fe.

²Carrera de Especialización en Bacteriología Clínica. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. UNL. Paraje el Pozo. Santa Fe.
Luciana Allignani: 4 de enero 2586 int. 5, CP (3000) Santa Fe,
Teléfono: 0342-4520357. E-mail: lucianaallignani@hotmail.com

RESUMEN: Desde 2008, CLSI no recomienda disco de vancomicina (VAN) para detectar sensibilidad de *Staphylococcus aureus*.

Sugiere métodos de dilución o E-test para estudiar sensibilidad intermedia (VISA), pero no heteroresistentes (h-VISA). El método de predifusión con tabletas Neo-Sensitabs de ROSCO detecta ambos.

El objetivo fue investigar VISA por dilución en agar, VISA y h-VISA por predifusión y aplicar este método con discos de papel.

Se estudiaron 80 *S. aureus* meticilino resistentes. Se realizó dilución en agar (CLSI) para VAN y predifusión para VAN y teicoplanina (TEI) con tabletas y discos. La CIM de VAN fue $\leq 2 \mu\text{g/mL}$. Por el método de predifusión los halos fueron ≥ 22 , ≥ 21 , ≥ 30 y ≥ 29 mm para VAN y TEI con tabletas y discos respectivamente.

No se encontraron VISA ni h-VISA. La técnica de predifusión con discos, sería recomendable, pero se necesitan mayor número de VISA para establecer puntos de corte.

PALABRAS CLAVE: *S. aureus*, sensibilidad a vancomicina, sensibilidad heterogenia a vancomicina, método de predifusión.

SUMMARY: *Vancomycin susceptibility and heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus: a simple and accessible method for clinical microbiology laboratories.*

Since 2008, the CLSI has not been recommending the use of the vancomycin (VAN) disk to detect *Staphylococcus aureus* susceptibility. Instead, it recommends dilution or E-test methods to investigate vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA); however, they do not detect heterogeneous vancomycin-intermediate ones (h-VISA). The ROSCO tablets prediffusion method is able to detect both types of resistance. The aim of this work was to investigate VISA by the agar dilution method and VISA and h-VISA by the prediffusion technique, applying this method with paper disks. Eighty methicillin-resistant *S. aureus* were

studied. VAN susceptibility was detected by the agar dilution method. The prediffusion technique for VAN and teicoplanine (TEI) was applied using tablets and paper disks. The VAN MIC was $\leq 2 \mu\text{g/mL}$. When the prediffusion method was performed, it showed inhibition zones $\geq 22 \text{ mm}$, $\geq 21 \text{ mm}$, $\geq 30 \text{ mm}$, 29 mm for VAN and TEI, with tablets and disk, respectively. VISA or h-VISA

strains were not found by any of the methods studied. The prediffusion technique, using paper disks, would be recommended but it is necessary to study a greater number of VISA strains to set breakpoints. **KEYWORDS:** *S. aureus*, vancomycin intermediate susceptibility, heterogeneous vancomycin-intermediate susceptibility, prediffusion method.

Introducción

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es uno de los agentes patógenos más importantes de nuestros tiempos. Puede producir infecciones localizadas e invasivas pudiendo ser tanto ambulatorias como asociadas a cuidados de la salud.

A principios de la década de los '40, todos los aislamientos eran sensibles a la penicilina; en 1948 aparecen los primeros *S. aureus* productores de betalactamasa por lo que fue necesario sintetizar penicilinas resistentes a esta enzima para su tratamiento. Surgen así antimicrobianos (AM) tales como meticilina, oxacilina y sus derivados.

A comienzos de 1960, al poco tiempo de la incorporación de estos últimos, emergieron en Inglaterra los primeros *S. aureus* resistentes a meticilina (SAMR) y desde entonces se diseminaron por todo el mundo. Este microorganismo se dividió en dos grandes grupos: *S. aureus* meticilino sensible y SAMR, lo que resulta y continúa siendo de gran impacto clínico, ya que SAMR no se podría tratar con betalactámicos y se tendría que recurrir al uso de glucopéptidos, siendo vancomicina (VAN), el antibiótico de elección (1).

Según el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), organismo estadounidense que establece los puntos de corte de los diversos AM frente a los distintos microorganismos, *S. aureus* debe considerarse

sensible a VAN cuando la concentración inhibitoria mínima (CIM) sea $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ y resistente cuando la CIM de VAN resulte $\geq 16 \mu\text{g/mL}$. *S. aureus* con CIM de VAN de 4 a $8 \mu\text{g/mL}$ se denominan *S. aureus* con sensibilidad intermedia (VISA) (2).

La mayoría de los aislamientos SAMR son inhibidos por concentraciones de VAN menores o iguales a $2 \mu\text{g/mL}$. Sin embargo, debido al aumento de dichas infecciones y por el incremento del uso de este AM, emergieron SAMR con sensibilidad disminuida a este antibiótico (VISA). El primer VISA se aisló en Japón, con verdadera sensibilidad homogénea a VAN siendo la CIM igual a $8 \mu\text{g/mL}$, y se detectó por el método de microdilución en caldo. Dicha cepa se denominó Mu50 (3). Luego se reportaron mayor número de aislamientos en Japón y en otras partes del mundo (4,5).

Posteriormente surgió una segunda cepa Mu3 con resistencia heterogénea a VAN denominada hetero-VISA (h-VISA). Cuando este aislamiento crecía en un medio libre de AM, expresaba subpoblaciones con distintos grados de resistencia a VAN; pero, en presencia de concentraciones de VAN $\geq 8 \mu\text{g/mL}$, la cepa Mu3 producía subclones con CIM de VAN igual a $8 \mu\text{g/mL}$, en una frecuencia mayor o igual a 1.10^6 UFC/mL (6,7).

Las infecciones producidas por h-VISA causan graves problemas en su detección. Dichas cepas son sensibles a VAN *in vitro* (CIM $\leq 2 \mu\text{g/mL}$) y por lo tanto se clasifican como sensibles según CLSI, pero contienen subpoblaciones (generalmente 1 en 10^6 UFC/ml) que pueden crecer en presencia de $4 \mu\text{g/mL}$ de VAN, por lo que se los categoriza como de sensibilidad intermedia (7).

Por tal motivo, desde el año 2008, el CLSI no recomienda la utilización del método de difusión con discos para la detección de la sensibilidad de VAN frente a *S. aureus* (2). Esto se debe a la pobre difusión de dicho AM en el agar por lo que sólo está normatizada la determinación de la CIM por el método de dilución o mediante la técnica epsilométrica usando tiras con gradiente de concentración de dicho antibiótico (E-test) para el estudio de VISA. Lamentablemente esta técnica no detecta las cepas hetero-VISA.

Diversos reportes han propuesto distintas metodologías para su investigación, pero la técnica estándar para detectar *S. aureus* h-VISA aún no está bien definida. El análisis del perfil poblacional es considerado el "gold standard" (8,9). Otras técnicas utilizadas son el macro E-test y el E-test de detección de resistencia a glicopéptidos (DRG), los cuales se realizan en medio agar suplementado con 5% de sangre de carnero. Todos los métodos antes mencionados son laboriosos y de alto costo para el laboratorio de microbiología clínica (7,10,11).

El microbiólogo danés Frolund-Thomsen desarrolló una técnica de predifusión (PD) utilizando tabletas Neo-Sensitabs de ROSCO de VAN ($30 \mu\text{g}$) y teicoplanina (TEI) ($30 \mu\text{g}$), este último AM resulta más sensible para detectar los aislamientos *S. aureus* VISA y h-VISA. El fundamento de este

método consiste en permitir que los AM predifundan en el medio y de esa manera las zonas de inhibición aumentan, aproximadamente 5 mm, entre dos valores de CIM consecutivos, respecto al método de difusión habitual. La PD resulta fácil y accesible para los laboratorios de nuestro medio (12). Los objetivos del presente trabajo fueron:

- a) investigar la presencia de VISA utilizando el método de dilución en agar.
- b) detectar la presencia de VISA y h-VISA mediante la técnica de PD con tabletas Neo-Sensitabs de VAN y TEI, de ROSCO.
- c) aplicar el método de PD utilizando discos de papel de VAN y TEI, habitualmente disponibles en los laboratorios de nuestro país y técnica aún no estandarizada.

Materiales y métodos

Se estudiaron 80 SAMR aislados de muestras clínicas de pacientes que asistieron al Hospital J.M. Cullen de la ciudad de Santa Fe durante el período diciembre 2010 a julio de 2011.

Se determinó la CIM de VAN por el método de dilución en agar según normas CLSI (13) y se realizó la técnica de PD con tabletas Neo-Sensitabs de ROSCO de VAN ($30 \mu\text{g}$) y TEI ($30 \mu\text{g}$) (12) y con discos de papel de VAN ($30 \mu\text{g}$) y TEI ($30 \mu\text{g}$) (Laboratorios Britania S.A.).

Se utilizaron las siguientes cepas controles: *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *S. aureus* VISA y h-VISA: cedidos por la Dra. Isabel Bogado de la Universidad Nacional de Rosario.

El método de PD se realizó siguiendo las recomendaciones del autor de la técnica: se depositaron dos tabletas Neo-Sensitabs de ROSCO, una de VAN y otra de TEI, en pla-

cas de agar Müeller-Hinton (MH) sin inocular. Se rotuló la base de las placas para identificar el lugar de cada tableta y se dejaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego de este período se extrajeron las tabletas y las placas se incubaron a temperatura ambiente 18 horas más. Posteriormente, las placas fueron inoculadas con una suspensión 0,5 Mac Farland de los aislamientos en estudio; se colocaron nuevas tabletas Neo-Sensitabs de ROSCO (de VAN y TEI) en otros sitios de la placa para observar el agrandamiento y se incubaron 24 h a 35° C. Se consideró *S. aureus* VISA y h-VISA cuando se obtuvieron valores de VAN \leq 22 mm y de TEI \leq 20 mm (12).

Idéntica técnica se utilizó con los discos de papel de VAN y TEI (14).

Resultados

Todos los SAMR estudiados tuvieron una CIM de VAN \leq 2 μ g/mL mediante el método de dilución, los que fueron categorizados como sensibles. La CIM de VISA y h-VISA resultaron 8 y 2 μ g/mL, respectivamente.

Aplicando el método de PD con tabletas Neo-Sensitabs de ROSCO, se observó agrandamiento del halo respecto a la difusión y todas las zonas de inhibición de pre-difusión resultaron \geq 23 mm con VAN y \geq 21 mm con TEI. La cepa control VISA mostró halo de inhibición igual a 14 mm con VAN y 15 mm con TEI; mientras que la h-VISA dio valores de 22 mm y 19 mm para VAN y TEI, respectivamente.

Con el método de PD, usando discos de papel, los halos obtenidos para las cepas estudiadas, fueron \geq 30 mm para VAN y \geq 29 mm para TEI. El halo de inhibición de la cepa VISA resultó igual a 24 mm para VAN y 25 mm para TEI; mientras que la h-VISA fue de 27 mm para ambos AM ensayados.

Discusión y conclusión

La sensibilidad reducida de *S. aureus* a VAN ha sido y continúa siendo un gran problema para la microbiología médica (15).

Existen en la literatura reportes de SAMR con valores elevados de CIM de VAN que superan el rango de sensibilidad (16,17). Sin embargo no todas las instituciones han comunicado un aumento en la CIM de VAN frente a *S. aureus* (18,19).

Hasta el momento, la prevalencia de h-VISA es desconocida dada la dificultad para detectarla fenotípicamente (20).

Los datos del presente trabajo difieren de los reportados por Richter y col. (21) quienes encontraron 11 h-VISA sobre 4.210 aislamientos clínicamente importantes, pero sugieren que la prevalencia global en Estados Unidos es baja (0,3%). En nuestro país, existen dos reportes de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a VAN (22,23). Lopardo y col., Sola y col. han comunicado el hallazgo de los tres primeros aislamientos h-VISA sobre 143 SAMR adquiridos en la comunidad en pacientes pediátricos (24,25). Perazzi y col. describieron un caso de endocarditis causada por *S. aureus* meticilino sensible y con sensibilidad heterogénea a VAN (26) mientras que Sola y col. reportaron otro caso de endocarditis infecciosa debida a un clon epidémico de *S. aureus* de la comunidad distinto al USA300 (27).

Estos datos no coinciden con los encontrados por este grupo de trabajo, donde no hubo cepas VISA ni h-VISA entre los aislamientos SAMR provenientes de pacientes adultos atendidos en el hospital J.M. Cullen de Santa Fe (14).

De los datos obtenidos se deduce que, VAN sigue siendo una buena opción para el tratamiento empírico de infecciones graves por SAMR en nuestro nosocomio ya

que no se detectaron VISA ni hetro-VISA por dilución en agar ni por PD con tabletas. Esto resulta de gran importancia clínica-epidemiológica ya que a este hospital concurren pacientes no sólo de la ciudad sino de zonas aledañas.

Respecto a la técnica de PD utilizando discos de papel se observó, igual que ocurrió con las tabletas, agrandamiento del halo para los aislamientos sensibles y menor zona de inhibición para las cepas controles VISA y h-VISA. Es importante destacar que esta última es una técnica novedosa, ya que no se encontraron antecedentes de ella en la bibliografía consultada. Sólo se reportaron trabajos que aplican la técnica de PD con tabletas Neo-Sensitabs para el estudio de la sensibilidad de glicopéptidos y daptomicina frente a *S. aureus* y de colistin con el complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* respectivamente (28-31). En conclusión la técnica de PD con discos de papel permite detectar de manera rápida, sencilla y económica tanto las cepas VISA como las hetero-VISA y resulta más accesible a los laboratorios de nuestro medio ya que todos disponen de discos de papel; pero, se necesitarían mayor número de cepas VISA y h-VISA a los fines de establecer puntos de corte.

Referencias Bibliográficas

- David, M.Z. y Daum, R.S., 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 3: 616-687.
- CLSI. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement. CLSI document. M100-S18, 2008. **28**, 1. Clinical Laboratory Standards Institute. Wayne. PA. USA.
- Hiramatsu, K.; Hanaki, H.; Ino, T.; Yabuta, K.; Oguri, T. y Tenover, F. C., 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**: 135-136.
- Smith, T.L.; Pearson, M.L.; Wilcox, K.R.; Cruz, C.; Lancaster, M.V.; Robinson-Dunn, B.; Tenover, F.C.; Zervos, M.J.; Band, J.D.; White, E. y Jarvis, W.R., 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* **340**: 493-501.
- Ploy, M.C. ; Grelaud, C.; Martin, C.; de Lumley, L. y Denis, F., 1997. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French Hospital. *Lancet.* **340**: 493-501.
- Hiramatsu, K.; Aritaka, N.; Hanaki, H.; Kawasaki, S.; Hosoda, Y.; Hori, S.; Fukuchi, Y. y Kobayashi, I., 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet.* **350**: 1670-1673.
- Howden, B.P.; Davies, J.K.; Johnson, P.D.R.; Stinear, T.P. y Grayson, M.L., 2010. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**: 99-139.
- Satola, S.W.; Farley, M.M.; Anderson, K.F. y Patel, J.B., 2011. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 173-183.
- Wootton, M.; Howe, R.A.; Hillman, R.; Walsh, T.R.; Bennett, P.M. y MacGowan, A.P., 2001. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**: 399-403.
- Aeschlimann, J.R.; Hershberger, E. y Rybak, M.J. 1999. Analysis of vancomycin

- population susceptibility profiles, killing activity, and postantibiotic effect against vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1914-1918.
- 11.** Van Hal, S.J.; Wehrhahn, M.C.; Barbagiannakos, T.; Mercer, J.; Chen, D.; Paterson, D.L. y Gosbell, I.B., 2011. Performance of various testing methodologies for detection of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in bloodstream isolates. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 1489-1494.
- 12.** Detection of VISA, GISA, hVISA, VRE, staphylococci daptomycin resistant, and *Acinetobacter/Pseudomonas* colistin resistant, using the Neo-Sensitabs predifusión method. [oi: medica-tec.com/chi/files/Predifusionsmethoden brochure.pdf](http://www.medica-tec.com/chi/files/Predifusionsmethoden_brochure.pdf)
- 13.** CLSI. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty Second Informational Supplement. CLSI document M100-S21, 2011. **31**, 1. Clinical Laboratory Standards Institute. Wayne. PA. USA.
- 14.** Mollerach, A.; Allignani, L.; Nagel, A.; Mendosa, M. A.; Bodrone, R.; Ramírez, R. y Méndez E. de los A., 2010. Investigación de *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia y hetero-intermedia a vancomicina; aplicación del método de predifusión con tabletas y discos de papel. *Rev. Arg. Microbiol.* **42**, 1: 163.
- 15.** Riederer, K.; Shemes, S.; Chase, P.; Musta, A.; Mar, A. y Khatib, R., 2011. Detection of intermediately vancomycin-susceptible and heterogeneous *Staphylococcus aureus* isolates: comparison of Etest and Agar screening methods. *J. Clin. Microbiol.* **49**, (6): 2147.
- 16.** Hussain, F.M.; Boyle-Vavra, S.; Shete, P.B. y Daum, R.S., 2002. Evidence for a continuum of decreased vancomycin susceptibility in unselected *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J. Infect. Dis.* **186**: 661-667.
- 17.** Lodise, T.P.; Graves, J.; Evans, A.; Graffunder, E.; Helmecke, M.; Lomaestro, B. M. y Stellrecht, K., 2008. Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 3315-3320.
- 18.** Alós, J.I.; García-Cañas, A.; García-Hierro, P. y Rodríguez-Salvanés, F., 2008. Vancomycin MICs did not creep in *Staphylococcus aureus* isolates from 2002 to 2006 in a setting with low vancomycin usage. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**: 773-775.
- 19.** Holmes, R.L. and Jorgensen, J.H., 2008. Inhibitory activities of 11 antimicrobial agents and bactericidal activities of vancomycin and daptomycin against invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained from 1999 through 2006. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 757-760.
- 20.** Pitz, A.M.; Yu, F.; Hermsen, E.D.; Rupp, M.E.; Fey, P.D. y Olsen, K.M., 2011. Vancomycin susceptibility trends and prevalence of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in clinical methicillin-resistant *S. aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 269-274.
- 21.** Richter, S.S.; Satola, S.W.; Crispell, E.K.; Heilmann, K.P.; Dohrn, C.L.; Riahi, F.; Costello, A.J.; Diekema, D.J y Doern, G.V., 2011. Detection of *Staphylococcus aureus* isolates with heterogeneous intermediate-level resistance to vancomycin in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **49**, (12): 4203-4207.
- 22.** De Paz, M.; Staneloni, M.; Ceriana, P.; Visus, M.; Greco, G.; Corso, A. y Barcan, L., 2010. Primer caso de *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) aislado en Argentina. IX Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología. SADI 2010, p. 64-65.

- 23.** Errecalde, L.; Ceriana, P.; Gagetti, P.; Erbin, M.; Corso, A.; Duarte, A.; Rolon, M.J.; Cuatz, D. y Kaufman, S., 2010. Primer aislamiento en Argentina de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente de la comunidad (CAMRSA) con sensibilidad intermedia a vancomicina (VISA) y no sensibilidad a daptomicina (ns-dap). XII Congreso Argentino de Microbiología, p. 155.
- 24.** Lopardo, H.; Casimir, L.; Egea, A.L.; Blanco, M.A.; Licciardone, N.; Mastroianni, A.; Bocco, J.L. y Sola, C., 2012. Bacteriemia persistente por hetero-VISA. Caso clínico. Rev. Arg. Microbiol. **44**, (1): 37.
- 25.** Sola, C.; Casimir, L.; Egea, A.L.; Hernández, C.; Blanco, M.A.; Mastroianni, A.; Pinheiro, J.L.; Bocco, J.L. y Lopardo, H., 2007. Hetero-VISA: estudio retrospectivo en *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina adquiridos en la comunidad (CO-MRSA) en pacientes pediátricos. X Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología. SADI 2011, p. 106.
- 26.** Perazzi, B.; Bello, N.; Mollerach, M.; Vay, C.; Lasala, M.B. y Famiglietti, A. 2011. Endocarditis caused by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin: a case report. J. Med. Case Reports. **5**: 292.
- 27.** Sola, C.; Lamberghini, R.O.; Ciarlantini, M.; Egea, A.L.; Gonzalez, P.; Diaz, E.G.; Huerta, H.; Gonzalez, J.; Corso, A.; Vilaro, M.; Petiti, J.P.; Torres, A.; Vindel, A. y Bocco, J.L., 2011. Heterogeneous vancomycin-intermediate susceptibility in a community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic clone, in a case of infective endocarditis in Argentina. Annals of Clin. Microbiol. and Antimicrob. **10**: 15.
- 28.** Nielsen, S.V. y Casals, J.B. 2005. Detection of decreased susceptibility to glycopeptides in *Staphylococcus aureus* using tablet (disc) prediffusion. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Abstract number: 1134_02_67 Copenhagen. Denmark
- 29.** Katz, B.D.; Luperchio, S.A. y Thorne, G.M. 2008. Detection of daptomycin-nonsusceptible strains using the Neo-Sensitab prediffusion method. Diagn Microbiol Infect Dis. **61**, (3):315-320.
- 30.** Herrera, M.E.; Mobilia, L.N.; Posse, G.R. 2011. Sensibilidad de *Acinetobacter* a la colistina evaluada mediante los métodos de predifusión y de concentración inhibitoria mínima. Detección de aislamientos heterorresistentes. Revista Argentina de Microbiología **43**: 115-119.
- 31.** Borda, N.; Mari, R.; Tome, G.; Cocconi, E.; Morettin, A.; Limansky, A.; Cera, G.; Notario, R.; Fay, F.; Casellas, J.M. y Bou Casals, J. 2006. 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, Resumen 16431, p. 82, Buenos Aires, Argentina.