

CONTROL DE CALIDAD DE BACTERIOLOGÍA (B-3/09)

En el presente control se envió a los participantes un producto liofilizado con una única cepa identificada por el laboratorio de referencia como *Klebsiella pneumoniae*. La historia clínica correspondía a un paciente varón de 65 años de edad, hipertenso y con enfermedad pulmonar obstructiva crónica grave, que fue ingresado en la Unidad de Cuidados Intensivos por un cuadro de reagudización de su afección pulmonar, con deterioro clínico, y que requirió intubación y ventilación mecánica. Tras instaurar un tratamiento antibiótico empírico, se observó una mejoría clínica inicial pero, al cuarto día, las secreciones bronquiales aumentaron, con un aspecto purulento, aunque sin traducción clínica. Al séptimo día de intubación, el paciente presentó un pico febril de 39°C, con una imagen radiológica de condensación lobar. Se tomaron muestras de broncoaspirado, que fueron remitidas al laboratorio de Microbiología para cultivo bacteriológico creciendo, a las 24 h, la bacteria que es objeto de este control.

Se solicitó a los participantes la **identificación** y el estudio de **sensibilidad** de la cepa remitida. Así mismo, podían hacerse en la hoja de respuesta los **comentarios** microbiológicos, clínicos, terapéuticos, etc. que se estimasen oportunos. El objetivo principal de este control fue evidenciar la capacidad de los participantes para detectar el patrón de sensibilidad de la cepa, ya que se trataba de una *K. pneumoniae* productora de una betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y de una cefamicinasa (AmpC) plasmídica, aislada en un broncoaspirado de procedencia nosocomial.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La cepa problema fue enviada a los 269 centros participantes, de los que remitieron hoja de respuesta 248, lo que supone un porcentaje de participación del 92,2%, superior al de los últimos controles. La práctica totalidad de los participantes identificaron correctamente el género y la especie (99,2%). Un centró identificó la cepa control como *Enterobacter aerogenes* y otro laboratorio informó *Enterococcus faecalis* (tabla 1).

Tabla 1. Resultados de la identificación bacteriana.

Identificación	Número	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	246	99,2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0,4
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0,4
Total	248	100,0

La gran mayoría de los centros (239, el 96,4%) emplearon técnicas comerciales para identificar la cepa (tabla 2). De éstos, 3 participantes (1,2%) usaron, además, métodos manuales. En esta ocasión, ninguno de los centros realizó un estudio de secuenciación, debido a la facilidad de la identificación de dicha cepa con las técnicas habituales de los laboratorios.

Tabla 2. Métodos utilizados en la identificación.

Método	Número	%
Comercial	236	95,2
Manual + comercial	3	1,2
Manual	5	2,0
No informa	4	1,6
Total	248	100,0

Los sistemas comerciales utilizados se resumen en la tabla 3. Los más empleados fueron el Vitek/Vitek 2 (88 centros) y Microscan (87 centros), seguidos del Wider (37 centros) y las galerías API (19 centros).

Tabla 3. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Método comercial	Número	% uso	% acierto
Vitek / Vitek 2	88	36,8	100,0
Microscan	87	36,5	98,9 ^a
Wider	37	15,5	100,0
Galerías API			
API 20E	16	6,3	100,0
API 10S	2	0,8	100,0
API 20NE	1	0,4	0
API no especificado	1	0,4	50,0
Phoenix	4	1,7	100,0
RapID One System	1	0,4	100,0
No especifica el sistema utilizado	3	1,2	100,0
Total	239	100,0	99,2

^aPresumiblemente, el participante empleó un panel de grampositivos.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

GENERALIDADES

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a los 246 centros que realizaron la identificación de *K. pneumoniae*. De ellos, solamente uno no realizó el estudio de sensibilidad, con lo que se analizaron 245 antibiogramas. El número de participantes que determinó la CMI mediante una técnica automatizada de microdilución en caldo fue de 213 (86,9%), empleándose como método único en el 68,2% de los casos. Fueron 63 (25,7%) los centros que realizaron una técnica de difusión en disco-placa, de los que 24 (9,8%) lo hicieron de forma exclusiva. Un total de 17 laboratorios (6,9%) utilizó tiras E-test®, de los cuales 2 (0,8%) lo hicieron como técnica única. Tres participantes no especificaron el método empleado (tabla 4).

Tabla 4. Métodos empleados en el antibiograma.

Método	Número	%
CMI por microdilución	167	68,2
CMI + disco-placa	32	13,1
Disco-placa	24	9,8
CMI + E-test®	8	3,3
CMI + disco-placa + E-test®	6	2,4
E-test®	2	0,8
Concentración crítica	2	0,8
Disco-placa + E-test®	1	0,4
No especificado	3	1,2
Total	245	100,0

Sobre un total de 213 respuestas, los equipos más utilizados para la realización del antibiograma mediante microdilución fueron los sistemas automatizados Vitek/Vitek 2 (40,4%) y Microscan (39,4%), seguidos del Wider (16,4%). Los datos se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Marcas empleadas en el antibiograma.

Marca	Número	%
Vitek/Vitek 2	86	40,4
Microscan	84	39,4
Wider	35	16,4
Phoenix	4	1,9
Sensititre	2	0,9
Preparación propia	1	0,5
No específica	1	0,5
Total	213	100,0

Los resultados de sensibilidad antibiótica suministrados por el centro que actuó como laboratorio de referencia (tabla 6) fueron obtenidos por diversos métodos: difusión en disco-placa, microdilución (Microscan) y E-test® y se muestran en la tabla 6. Como siempre, esta lista se incluye a título meramente informativo, como término de comparación para los participantes, sin que suponga una recomendación de uso en el tratamiento de las infecciones por esta bacteria. El laboratorio de referencia usó los criterios del CLSI correspondientes a la familia *Enterobacteriaceae* para la interpretación de los resultados.

Tabla 6. Sensibilidad antibiótica de la cepa.

Antibiótico	Interpretación ^a	Antibiótico	Interpretación ^a
Ampicilina/amoxicilina	R	Imipenem	S
Amoxicilina-clavulanato	R	Meropenem	S
Piperacilina-tazobactam	R	Ertapenem	S
Cefuroxima	R	Gentamicina	S
Cefoxitina	R	Tobramicina	R
Cefotaxima/ceftriaxona	R	Amikacina	I
Ceftazidima	R	Ciprofloxacino	R
Cefepima	R	Cotrimoxazol	R
Aztreonam	R	Tigeciclina	S

^aR: resistente; S: sensible; I: intermedio.

Se realizó la detección de BLEE mediante la prueba de sinergia con doble disco de amoxicilina-clavulanato y de cefepima, cefotaxima, aztreonam y ceftazidima. La presencia de esta enzima se confirmó también mediante CMI diferencial de la cefotaxima y ceftazidima, solas y combinadas con ácido clavulánico, así como por secuenciación (CTX-

M9). La detección de cefamicinasa se llevó a cabo mediante la prueba de doble difusión con discos, comprobando el efecto inhibitorio de la cloxacilina y el ácido borónico.

Por otra parte, se solicitó a tres profesionales con experiencia un listado de los antibióticos que consideraran deberían ser incluidos en el estudio de sensibilidad de esta bacteria (tabla 7), sirviendo así como una aproximación o guía general. Desde el Programa de Control de Calidad, se considera que la adecuación de los antibióticos seleccionados por cada centro al caso clínico concreto es un criterio añadido de verdadera calidad en Microbiología Clínica. Como en otras ocasiones, estos profesionales basaron su selección en los siguientes criterios: a) tratarse de opciones terapéuticas de primera elección, b) constituir alternativas en ciertas situaciones clínicas, c) servir como criterio adicional para la identificación precisa de la especie bacteriana, marcador fenotípico, etc. y d) para conocer la epidemiología de la resistencia en un determinado ámbito geográfico.

Tabla 7. Antibiograma ideal según tres profesionales.

Experto 1	Experto 2	Experto 3
Ampicilina/amoxicilina	Ampicilina/amoxicilina	Ampicilina/amoxicilina
Amoxicilina-clavulanato	Amoxicilina-clavulanato	Amoxicilina-clavulanato
Ticarcilina	Ticarcilina	Ticarcilina
Piperacilina	Piperacilina	Piperacilina
Piperacilina-tazobactam	Piperacilina-tazobactam	Piperacilina-tazobactam
	Cefazolina	
Cefuroxima	Cefuroxima	Cefuroxima
Cefoxitina	Cefoxitina	Cefoxitina
Cefotaxima/ceftriaxona	Cefotaxima/ceftriaxona	Cefotaxima/ceftriaxona
Ceftazidima	Ceftazidima	Ceftazidima
Cefepima	Cefepima	Cefepima
	Aztreonam	Aztreonam
Ertapenem		
Imipenem	Imipenem	Imipenem
	Meropenem	Meropenem
Gentamicina	Gentamicina	Gentamicina
Tobramicina	Tobramicina	Tobramicina
Amikacina	Amikacina	Amikacina
Ácido nalidíxico		
Ciprofloxacino	Ciprofloxacino	Ciprofloxacino
Tigeciclina		Tigeciclina
Cotrimoxazol	Cotrimoxazol	Cotrimoxazol

Además, 2 de los 3 expertos señalaron explícitamente que, ante el perfil de resistencia que presentaba la cepa, era obligado realizar pruebas fenotípicas para la detección de BLEE (sinergia con discos, microdilución con inhibidores, etc.) y cefamicinasa AmpC (pruebas fenotípicas de inhibición con ácido fenil borónico o cloxacilina). Para el Programa, la caracterización fenotípica de una BLEE y una AmpC mediante estos métodos se consideró suficiente para obtener una valoración óptima del resultado, ya que la confirmación mediante métodos moleculares sólo era exigible a centros de referencia.

Las respuestas de los laboratorios variaron desde aquéllos que refieren muy pocos antibióticos en sus pruebas de sensibilidad, a otros que estudian hasta 20 diferentes. Los antibióticos que fueron informados por un mayor número de participantes se ajustan bastante a las necesidades terapéuticas y al "patrón ideal" que se desprende de la opinión de dos o más de los expertos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS

En la tabla 8 se resumen los resultados de las pruebas cualitativas de sensibilidad cuando el número de respuestas para un determinado antibiótico fue igual o superior a 35. En total, se han recibido resultados correspondientes a 52 antibióticos diferentes.

De forma mayoritaria, los participantes mostraron unos resultados concordantes con los aportados por el laboratorio de referencia para los antibióticos ampicilina/amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, piperacilina-tazobactam, cefalotina/cefazolina, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, aztreonam, imipenem, meropenem, gentamicina y tobramicina. Sin embargo, conviene resaltar algunas discrepancias, sobre todo las que afectan a la interpretación del fenotipo de resistencia. Así, el 8,6% de los laboratorios consideró que la cepa era sensible a la cefepima, y el 14,7% que mostraba una sensibilidad intermedia a este antibiótico, aunque al ser una bacteria portadora de BLEE debiera haber llevado a la interpretación de "Resistente", con independencia de la CMI o del diámetro del halo obtenido. Respecto a la ertapenem, la mayoría de centros que informan este antimicrobiano refieren una CMI entre 2 (sensible) y 4 (sensibilidad intermedia).

Cerca del 30% de los centros que informaron el cotrimoxazol indicaron que la cepa era sensible a este antibiótico, de los que el 70% de los mismos realizaron el Vitek/Vitek 2. La CMI medida por Vitek da un valor de 40 (sensible), mientras que al realizar E-test®, se obtiene una CMI de 76, que se considera resistente.

La práctica totalidad de participantes informó correctamente que la cepa control era sensible a la gentamicina y resistente a la tobramicina, probablemente debido a poseer el gen de la acetiltransferasa de aminoglucósidos *aac(6')*, que confiere dicho fenotipo de resistencia (sensibilidad a la gentamicina y resistencia a la tobramicina). Si bien la

amikacina se afecta poco por dicho enzima, presenta una CMI de 16 (medida tanto por E-test® como por los sistemas automatizados), con lo que sería preferible informar "Intermedio".

Tabla 8. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos.

Antibiótico	Número	Interpretación ^a			
		Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta
Ampicilina/amoxicilina	135	0	0	135 (100,0)	0
Amoxicilina-clavulanato	226	0	0	226 (100,0)	0
Piperacilina-tazobactam	128	0	0	128 (100,0)	0
Cotrimoxazol	118	35 (29,7)	3 (2,5)	80 (67,8)	0
Cefalotina/cefazolina	97	0	0	97 (100,0)	0
Cefuroxima	127	0	0	127 (100,0)	0
Cefoxitina	122	0	0	122 (100,0)	0
Cefotaxima	199	1 (0,5)	0	198 (99,5)	0
Ceftazidima	148	0	0	148 (100,0)	0
Cefepima	150	13 (8,6)	22 (14,7)	115 (76,7)	0
Aztreonam	90	0	0	90 (100,0)	0
Imipenem	224	220 (98,3)	1 (0,4)	2 (0,9)	1 (0,4)
Meropenem	80	80 (98,8)	0	0	1 (1,2)
Ertapenem	60	40 (66,7)	10 (16,7)	9 (15,0)	1 (1,6)
Ciprofloxacino	208	1 (0,5)	0	207 (99,5)	0
Gentamicina	220	209 (95,0)	1 (0,5)	9 (4,1)	1 (0,5)
Tobramicina	137	0	0	137 (100,0)	0
Amikacina	160	104 (65,0)	43 (26,9)	13 (8,1)	0

^aLos números entre paréntesis indican porcentajes sobre el total de ensayos para cada antibiótico.

DETECCIÓN DEL FENOTIPO DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS

Como ya se ha indicado, el objetivo principal de este control fue comprobar si los participantes eran capaces de detectar que la cepa era productora de BLEE junto con una cefamicinasa (AmpC) plasmídica, y evaluar la interpretación del fenotipo de resistencia resultante (resistencia a la penicilina, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, cefepima y aztreonam debido a la presencia de una BLEE, con resistencia añadida a las combinaciones con inhibidores de β -lactamasas por la producción de AmpC). Los resultados se detallan en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados de la detección de la producción de BLEE y de AmpC.

Característica especial	Número	%
Cepa productora de BLEE	42	17,0
Cepa productora de AmpC plasmídico (cefamicinasa).	41	16,5
Cepa productora de BLEE + alteración permeabilidad	33	13,3
Cepa productora de BLEE + producción de AmpC plasmídico (cefamicinasa)	29	11,7
Cepa multiresistente	12	4,9
Cepa productora de BLEE + producción AmpC plasmídico + alteración permeabilidad	9	3,6
Cepa hiperproductora de AmpC (ó AmpC desreprimido)	8	3,2
Cepa productora de BLEE + hiperproducción de AmpC	3	1,2
Cepa productora de BLEE + producción de carbapenemasa	3	1,2
Cepa productora de AmpC y/o alteración de la permeabilidad	3	1,2
Cepa hiperproductora de betalactamasa	2	0,8
Cepa productora de BLEE ó de AmpC plasmídica (cefamicinasa)	1	0,4
Cepa productora de BLEE + producción de IRT	1	0,4
Cepa productora de BLEE + hiperproducción de SHV-1	1	0,4
Cepa productora de AmpC plasmídico + hiperproducción betalactamasa cromosómica	1	0,4
Cepa productora de carbapenemasa	1	0,4
Sin comentarios acerca de la resistencia antibiótica	58	23,4
Total	248	100,0

Resumiendo estos comentarios, casi la mitad de los participantes (122 centros, el 49,2%) informaron correctamente que la cepa era productora de BLEE; mientras que 84 laboratorios (33,9%) informaron que dicha cepa producía una cefamicinasa (AmpC) plasmídica. Algunos centros (14, el 5,6%) informaron como mecanismo de resistencia la hiperproducción de AmpC cromosómica o la desrepresión de la misma, lo que supone un error, debido a que *Klebsiella*, junto con *Salmonella*, son las únicas enterobacterias que no producen AmpC cromosómica. Si se prescinde del lugar de la codificación genética y sólo se valora el dato de que la cepa poseía una cefamicinasa, un total de 41 participantes (el 16,5%) interpreta correctamente el patrón de sensibilidad antibiótica (BLEE+AmpC); la mayoría de ellos lo comprueba con pruebas fenotípicas y, unas pocas respuestas, procedentes de laboratorios de referencia en este campo, afirman haberlo comprobado mediante métodos genéticos.

Debido a la gran dificultad que entrañaba este control, los resultados pueden ser considerados como bastante satisfactorios. Ciertamente son inferiores al de otros controles de calidad en los que se remitieron otras cepas productoras de BLEE (suelen superar el 70-80%), aunque hay que señalar que, si consideramos aisladamente esta característica, la mitad de participantes (122, el 49,2%) manifestó explícitamente que la cepa era productora de una enzima BLEE. Lógicamente la presencia de resistencia a la combinación amoxicilina-clavulanato por la presencia de una AmpC plasmídica complicó la interpretación del patrón de sensibilidad y explica este menor porcentaje de aciertos, pero el hecho de que casi una cuarta parte de los participantes acertasen el fenotipo conjunto puede considerarse una buena noticia respecto a la cualificación de los participantes, máxime si tenemos en cuenta que muchos de ellos probablemente proceden de centros con un nivel de sofisticación técnica moderado (hospitales comarcales, etc.).

UTILIZACIÓN DE LABORATORIO EXTERNO

Respecto a la necesidad de utilizar un laboratorio externo para la identificación de la cepa o para el estudio de sensibilidad, se obtuvieron los siguientes datos: 239 laboratorios (96,4%) afirmaron no haberlo utilizado, 4 centros (1,6%) declararon haberlo requerido y 3 centros (1,2%) lo utilizaron parcialmente. Hubo 2 respuestas (0,8%) que no aportaron información al respecto.

COMENTARIOS

Como se ha señalado anteriormente, bastantes participantes comentaron que se trataba de una bacteria productora de BLEE (122 centros), o que producía una cefamicinasa (AmpC) plasmídica (84 centros). Algunos de ellos (36 centros) añadieron además que la bacteria era resistente a algunos aminoglucósidos por poseer el gen *aac(6)*.

Otros comentarios mayoritarios fueron acerca de recomendaciones terapéuticas, principalmente el tratamiento con imipenem o meropenem (algunos centros sugieren asociarlo a la gentamicina). Por último, algunos participantes recomendaron medidas preventivas de aislamiento de contacto del paciente para evitar la diseminación de una cepa tan peligrosa.