

## CONTROL DE CALIDAD DE BACTERIOLOGÍA (B-2/13)

En el presente control se envió a los participantes un producto liofilizado con una única cepa identificada por el laboratorio de referencia como *Pseudomonas putida*, identificada mediante una galería comercial de pruebas bioquímicas (Vitek 2, bioMérieux) y confirmada mediante secuenciación del ARN ribosómico 16S de la misma. Esta cepa de *P. putida* remitida tenía la particularidad de ser productora de una metalobetalactamasa (MBL) de tipo VIM-1. La historia clínica correspondía a la de un paciente varón de 56 años de edad que ingresaba en la Unidad de Cuidados Intensivos por presentar traumatismo craneal tras haberse precipitado desde un andamio en accidente laboral. El paciente, que estaba sometido a ventilación mecánica, había presentado al décimo día de su ingreso un importante empeoramiento de los parámetros respiratorios, con aumento de las secreciones traqueales que se hacían purulentas y fiebre de 39° C, a pesar de llevar cobertura antibiótica profiláctica. Se realizó una radiografía de tórax, observándose un área de condensación en lóbulo superior izquierdo que sugería el diagnóstico de neumonía asociada a ventilación mecánica, a falta de la confirmación microbiológica. Se tomó una muestra de aspirado broncoalveolar y se remitió al Servicio de Microbiología para estudio bacteriológico y micológico, aislándose 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, o al menos sospechar, que la cepa del control era productora de una MBL.

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La cepa problema fue enviada a los 250 centros participantes, de los que 233 remitieron hoja de respuesta con datos analizables, lo que supone un porcentaje de participación del 93,2%, porcentaje muy similar al del último control (91,6%). El Programa de Control de Calidad aceptó como válidas las identificaciones *P. putida* (respuesta óptima), así como la de *P. fluorescens / putida*. De este modo, más de la mitad de los centros (66,1%) identificaron correctamente el género y la especie, y otro 3,9% respondieron *Pseudomonas fluorescens / putida*, por lo que el porcentaje de respuestas aceptables fue del 70,0%. Del resto de las identificaciones informadas (tabla 1), destaca que el 25,3% de los participantes informaron *Pseudomonas aeruginosa*. El porcentaje de aciertos de este control es superior al control de Bacteriología B-3/08, en el que se remitió la misma cepa de *P. putida* productora de MBL. En dicho control, un 59,7% de los centros participantes informaron *P. putida*.

**Tabla 1. Resultados de la identificación bacteriana.**

Identificación	Número	%
<i>Pseudomonas putida</i>	154	66,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59	25,3
<i>Pseudomonas fluorescens / putida</i>	9	3,9
<i>Burkholderia cepacia</i>	3	1,3
Género <i>Pseudomonas</i>	2	0,9
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	0,9
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0,4
Bacilo gramnegativo no fermentador	1	0,4
<i>Providencia stuartii</i>	1	0,4
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	0,4
Total	233	100,0

En este control, la gran mayoría de los centros (213, el 91,4%) emplearon técnicas comerciales para identificar la cepa, de los que 167 (71,7%) las usaron como único método (tabla 2). Respecto a las pruebas manuales, fueron informadas por 30 laboratorios (12,9%), 4 de ellos (1,7%) de forma única. La espectrometría de masas fue utilizada por 33 centros (14,2%). Por último, sólo 2 laboratorios (0,9%) realizaron un estudio de secuenciación para su identificación.

**Tabla 2. Métodos utilizados en la identificación.**

Método	Número	%
Comercial	167	71,7
Manual + comercial	24	10,3
Comercial + Espectrometría de masas	20	8,6
Espectrometría de masas	12	5,2
Manual	4	1,7
Comercial + PCR	1	0,4
Comercial + Secuenciación + Espectrometría de masas	1	0,4
Manual + aglutinación	1	0,4
Manual + secuenciación	1	0,4
No informa	2	0,9
Total	233	100,0

Los sistemas comerciales utilizados se muestran en la tabla 3, mientras que la capacidad de los sistemas comerciales mayoritarios para identificar la cepa se resume en la tabla 4.

**Tabla 3. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.**

Método comercial	Número	% uso	% acierto
Vitek 2	84	34,2	90,5
Microscan	70	28,5	25,7
Galerías API			
API 20 NE	34	13,8	100,0
API ID 32 GN	1	0,4	100,0
Maldi-Tof	33	13,4	81,8
Wider	11	4,5	36,4
Phoenix	3	1,2	66,7
BBL Crystal	2	0,8	0,0
RapID NF Plus	2	0,8	100,0
Sensititre	1	0,4	100,0
No especifica el sistema utilizado	5	2,0	60,0
Total	246	100,0	94,2

**Tabla 4. Resultados de identificación de *Pseudomonas* con los sistemas mayoritarios.**

Sistema	Número usuarios	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens/putida</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Género <i>Pseudomonas</i>	<i>P. fluorescens</i>
Vitek 2	84	76 (90,5)	1 (1,2)	7 (8,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
Microscan	70	18 (25,7)	6 (8,6)	42 (60,0)	1 (1,4)	1 (1,4)
API 20 NE	34	34 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Maldi-Tof	33	27 (81,8)	2 (6,1)	3 (9,1)	1 (3,0)	0 (0,0)
Wider	11	4 (36,4)	1 (9,1)	4 (36,4)	0 (0,0)	0 (0,0)

Los mejores resultados se obtuvieron con la galería API 20NE (bioMérieux) seguido del sistema Vitek 2. Así, los 34 participantes que emplearon el API 20NE (100,0%) obtuvieron la identificación óptima de *P. putida*; mientras que, en el caso del Vitek 2, fueron 76 de 84 laboratorios (90,5%) los que identificaron correctamente la cepa como *P. putida*. Los sistemas Microscan y Wider se revelaron insuficientes para alcanzar la identificación, pues sólo 18 de 70 participantes que utilizaron Microscan (25,7%) y 4 de los 11 centros que emplean Wider (36,4%) remitieron la respuesta óptima de *P. putida*. Además, las frecuencias de identificación de *P. aeruginosa* fueron mayores con estos dos últimos sistemas comerciales. Por último, el 81,8% de los centros que utilizaron el Maldi-Tof informaron correctamente *P. putida*, porcentaje inferior al de otras ocasiones en que se remitieron otras bacterias de género o especie diferente.

## RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

### GENERALIDADES

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a los 227 centros que realizaron una identificación mínima de género *Pseudomonas*. Tres de estos centros no realizaron el estudio de sensibilidad, con lo que se analizaron un total de 224 antibiogramas. El número de participantes que determinó la CMI mediante una técnica automatizada de microdilución en caldo fue de 206 (92,0%), empleándose como método único en el 65,2% de los casos. Fueron 60 (26,8%) los centros que realizaron una técnica de difusión en disco-placa, de los que 14 (6,3%) lo hicieron de forma única. Se realizó E-test® en 27 laboratorios (12,1%), la inmensa mayoría empleados junto con otro método de sensibilidad. Un único participante (0,4%) no especificó el método empleado (tabla 5).

**Tabla 5. Métodos empleados en el antibiograma.**

Método	Número	%
CMI por microdilución	146	65,2
CMI + disco-placa	36	16,1
CMI + E-test®	15	6,7
Disco-placa	14	6,3
CMI + disco-placa + E-test®	9	4,0
E-test®	2	0,9
Disco-placa + E-test®	1	0,4
No especificado	1	0,4
Total	224	100,0

Sobre un total de 206 respuestas, los equipos más utilizados para la realización del antibiograma mediante microdilución fueron los sistemas automatizados Microscan (49,0%) y Vitek 2 (39,8%), seguidos del Wider (6,3%). Los datos se resumen en la tabla 6.

**Tabla 6. Marcas empleadas en el antibiograma.**

Marca	Número	%
Microscan	101	49,0
Vitek 2	82	39,8
Wider	13	6,3
Phoenix	5	2,4
Sensititre	4	2,0
Preparación propia	1	0,5
Total	206	100,0

Los resultados de sensibilidad antibiótica suministrados por el centro que actuó como laboratorio de referencia fueron obtenidos mediante microdilución (Microscan) y se muestran en la tabla 7. 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 *Pseudomonas* para la interpretación de los resultados y realizó, además, la detección de MBL mediante la prueba de la doble tira de E-test® con imipenem e imipenem + EDTA. La presencia de una MBL del tipo VIM-1 fue confirmada mediante amplificación y posterior secuenciación.

**Tabla 7. Sensibilidad antibiótica de la cepa.**

Antibiótico	Interpretación <sup>a</sup>	Antibiótico	Interpretación <sup>a</sup>
Ampicilina/amoxicilina	R	Imipenem	R
Amoxicilina-clavulanato	R	Meropenem	R
Piperacilina	R	Gentamicina	R
Piperacilina-tazobactam	R	Tobramicina	R
Cefoxitina	R	Amikacina	S
Cefotaxima	R	Colistina	S
Ceftazidima	R	Ciprofloxacino	R
Cefepima	R	Levofloxacino	R
Aztreonam	R		

<sup>a</sup>R: resistente; S: sensible.

Por otra parte, se solicitó a tres profesionales con experiencia una lista de los antibióticos que consideraran que deberían ser incluidos en el estudio de sensibilidad de esta bacteria, 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 puede considerarse como un criterio añadido de la calidad que ofrece. 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. Las distintas respuestas de los expertos se resumen en la tabla 8.

**Tabla 8. Antibiograma ideal según tres profesionales.**

Experto 1	Experto 2	Experto 3
Imipenem	Imipenem	Imipenem
Meropenem	Meropenem	Meropenem
Piperacilina		Piperacilina
Ticarcilina	Ticarcilina	
Piperacilina-tazobactam	Piperacilina-tazobactam	Piperacilina-tazobactam
Ceftazidima	Ceftazidima	Ceftazidima
Cefepima	Cefepima	
Aztreonam	Aztreonam	Aztreonam
Gentamicina	Gentamicina	Gentamicina
Tobramicina	Tobramicina	Tobramicina
Amikacina	Amikacina	Amikacina
Ciprofloxacino	Ciprofloxacino	
		Levofloxacino
Colistina	Colistina	Colistina
Cotrimoxazol		Cotrimoxazol

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: imipenem, meropenem, piperacilina, ticarcilina, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepima, aztreonam, gentamicina, tobramicina, amikacina, ciprofloxacino, colistina y cotrimoxazol.

#### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS

En este control se solicitó de nuevo a los participantes que informasen que criterios de puntos de corte utilizaron para la interpretación del antibiograma. De los 224 laboratorios que realizaron antibiograma con la identificación mínima de género *Pseudomonas*, 171 (76,3%) utilizaron los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), otros 51 (22,8%) los del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) y los 2 restantes (0,9%) según la bibliografía (tabla 9).

**Tabla 9. Criterios seguidos para la interpretación de los resultados.**

Marca	Número	%
CLSI	171	76,3
EUCAST	51	22,8
Bibliografía	2	0,9
Total	224	100,0

En la tabla 10 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 38 antibióticos diferentes.

**Tabla 10. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos.**

Antibiótico	Número	Interpretación <sup>a</sup>			
		Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta
Imipenem	205	1 (0,5)	–	204 (99,5)	–
Meropenem	152	–	–	152 (100,0)	–
Piperacilina-tazobactam	191	–	–	190 (99,5)	1 (0,5)
Ampicilina-sulbactam	42	–	–	42 (100,0)	–
Aztreonam	143	1 (0,7)	1 (0,7)	141 (98,6)	–
Ceftazidima	209	–	–	209 (100,0)	–
Cefepima	159	–	–	159 (100,0)	–
Gentamicina	188	3 (1,6)	1 (0,5)	184 (97,9)	–
Tobramicina	168	6 (3,5)	51 (30,4)	111 (66,1)	–
Amikacina	179	178 (99,4)	1 (0,6)	–	–
Ciprofloxacino	201	–	–	201 (100,0)	–
Levofloxacino	103	–	–	103 (100,0)	–
Cotrimoxazol	53	–	–	53 (100,0)	–
Fosfomicina	44	–	–	43 (97,7)	1 (2,3)
Colistina	197	194 (98,5)	1 (0,5)	1 (0,5)	1 (0,5)

<sup>a</sup>Los números entre paréntesis indican porcentajes sobre el total de ensayos para cada antibiótico.

De forma mayoritaria, los participantes mostraron unos resultados concordantes con los aportados por el laboratorio de referencia para todos los antibióticos, a excepción de la tobramicina, en la que se observó una moderada discrepancia entre los diferentes centros. Ello se debe, en parte, a los puntos de corte utilizados para la interpretación de la CMI, ya que CMIs de 8 µg/ml obtenidas por bastantes centros se interpretarían como intermedio según los puntos de corte del CLSI pero resistente según los del EUCAST.

## DETECCIÓN DEL FENOTIPO DE RESISTENCIA

Como ya se ha indicado, el objetivo principal de este control era comprobar si los participantes eran capaces de detectar, o al menos sospechar, que la cepa aislada en un contexto de una neumonía intrahospitalaria era productora de MBL, así como evaluar la interpretación del fenotipo de resistencia resultante (resistencia a las carbapenemas). Dicho objetivo se justificaba por la creciente frecuencia de aislamiento, aunque por el momento baja, de cepas MBL en nuestro país, así como por la coexistencia en *Pseudomonas* de varios mecanismos de resistencia a los betalactámicos que pueden hacer difícil la interpretación de un determinado fenotipo. Además, puesto que los determinantes de MBL están albergados en elementos genéticos móviles que pueden transportar otros genes de resistencia para otros grupos de antibióticos, está claro que estas cepas pueden plantear graves problemas de tratamiento en el futuro. En suma, parece obligado que los laboratorios de Microbiología españoles estén preparados para reconocer y detectar estas cepas.

Como se observa en la tabla 11, solamente 79 de los 233 participantes (el 33,9%) informaron de la presencia (o de la posibilidad) de que la cepa problema fuese productora de carbapenemasa, de los cuales 51 (21,9%) afirmaron que dicha cepa era productora de MBL. Aunque, a primera vista, los resultados pueden ser considerados como pobres, la valoración que hace el Programa es más positiva, y ello por varias razones. En primer lugar, se ha observado una mejoría en la detección de las MBL en comparación con el control B-3/08, en el que se remitió, como ya se ha comentado anteriormente, la misma cepa de *P. putida* productora de MBL. En dicho control, solamente el 16,1% de los participantes informaron de la posible producción de MBL, frente al 33,9% de este control. En segundo lugar, la presencia de cepas de *Pseudomonas* productoras de MBL, si bien es un problema en aumento, no deja de ser todavía un mecanismo minoritario de resistencia a las carbapenemas. En

tercer lugar, la coexistencia de dos mecanismos de resistencia a estos antibióticos hacía difícil interpretar el fenotipo a menos que se dispusiese de técnicas específicas de detección y, en este sentido, se recuerda que la cepa tampoco era sensible al aztreonam, lo que hubiera facilitado la sospecha de una carbapenemasa de tipo MBL. En cuarto lugar, hay que tener en cuenta que el aislamiento de este tipo de cepas se circunscribe esencialmente a hospitales terciarios y éstos constituyen sólo una parte dentro del espectro de los laboratorios participantes en el Programa. Por último, salvo casos anecdóticos, la práctica totalidad de los centros detecta correctamente el perfil de sensibilidad antibiótica, y bastantes de los cuales hacen el comentario -evidente- de la multiresistencia de la cepa, lo que indica indirectamente que sospechaban algo poco habitual.

Sin embargo, este control claramente pone de manifiesto la necesidad de mejora, lo que sin duda se producirá progresivamente, como ya ha ocurrido en otras facetas del Programa, por ejemplo en la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). También alerta sobre la conveniencia de que los laboratorios dispongan de técnicas y herramientas que faciliten la detección de carbapenemasas, algunas de ellas de fácil implantación en la mayoría de laboratorios.

**Tabla 11. Resultados de la detección de la producción de MBL.**

<b>Característica especial</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
Cepa productora de MBL	42	18,0
Cepa multiresistente	30	12,9
Cepa productora de carbapenemasa	15	6,5
Cepa productora de MBL de tipo VIM	9	3,9
Probable / posible cepa productora de MBL	8	3,4
Probable / posible cepa productora de carbapenemasa	4	1,7
Presencia de varios mecanismos de resistencia	2	0,9
Cepa productora de betalactamasa cromosómica inducible	1	0,4
Cepa productora de carbapenemasa, probable VIM	1	0,4
Impermeabilidad de membrana	1	0,4
Sin información específica	120	51,5
<b>Total</b>	<b>233</b>	<b>100,0</b>

#### **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: 225 laboratorios (96,6%) afirmaron no haberlo utilizado, 5 centros (2,1%) declararon haberlo requerido y 3 centros (1,3%) lo utilizaron parcialmente.

#### **COMENTARIOS**

Como se ha señalado anteriormente, algunos participantes (79 centros) comentaron que se trataba de una cepa productora de MBL/carbapenemasa, o al menos, mencionaron esta posibilidad. De éstos, unos pocos centros añadieron que habían realizado la prueba de la doble tira del E-test® con imipenem - imipenem+EDTA, o bien, una prueba de doble disco con EDTA, y/o un test de Hodge modificado. Otros participantes (30) comentaron que se trataba de una bacteria multiresistente.

Respecto a las recomendaciones terapéuticas (14), mayoritariamente recomendaron la asociación de amikacina y colistina. Algunos participantes (12) también recomendaron el aislamiento del paciente, junto con otras medidas de control epidemiológico como el estudio de portadores.