

CONTROL DE CALIDAD DE BACTERIOLOGÍA (B-4/13)

En el presente control se envió a los participantes un producto liofilizado con una única cepa identificada por el laboratorio de referencia como *Enterobacter cloacae*, mediante una galería comercial de pruebas bioquímicas (Microscan, Siemens) y confirmada esta identificación mediante secuenciación del ARN ribosómico 16S de la misma. Esta cepa de *E. cloacae* remitida tenía la particularidad de ser productora de una betalactamasa de espectro extendido (BLEE) del tipo CTX-M-9. La historia clínica correspondía a la de una paciente mujer de 53 años de edad que ingresaba en la Unidad de Cuidados Intensivos por un traumatismo abdominal grave a consecuencia de un accidente de tráfico. A los 12 días de su ingreso la paciente, que se encontraba bajo sedación, mantenida con ventilación mecánica y con tratamiento antibiótico empírico por sospecha de neumonía nosocomial, sufrió un acusado empeoramiento de su estado, con fiebre de 39,5°C y alteración de los parámetros respiratorios. Se tomaron muestras de broncoaspirado y hemocultivos que se remitieron al Servicio de Microbiología para cultivo bacteriológico y micológico, creciendo a las 24 h de incubación la cepa 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 BLEE.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La cepa problema fue enviada a los 250 centros participantes, de los que 237 remitieron hoja de respuesta con respuestas valorables, lo que supone un porcentaje de participación del 94,8%, porcentaje muy similar al del último control (93,2%). El Programa de Control de Calidad SEIMC sólo aceptó como válida la identificación correcta de género y especie (*E. cloacae*). Como se puede observar en la tabla 1, la gran mayoría de los participantes identificaron correctamente el género y la especie (97,5%), mientras que un 0,9% informó *Enterobacter aerogenes* y otro 0,4% *Cronobacter sakazakii* (anteriormente denominado *Enterobacter sakazakii*). De nuevo, algunas de las respuestas discordantes fueron debidas a identificaciones cruzadas de otros controles diferentes del programa.

Tabla 1. Resultados de la identificación bacteriana.

Identificación	Número	%
<i>Enterobacter cloacae</i>	231	97,5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	0,9
<i>Cronobacter sakazakii</i>	1	0,4
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0,4
<i>Escherichia coli</i>	1	0,4
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	1	0,4
Total	237	100,0

En este control, la gran mayoría de los centros (221, el 93,3%) emplearon técnicas comerciales para identificar la cepa, de los que 198 (83,5%) las usaron como único método (tabla 2). Respecto a las pruebas manuales, fueron informadas por 10 laboratorios (4,2%), 2 de ellos (0,9%) de forma única. La espectrometría de masas fue utilizada por 28 centros (11,8%), 11 de ellos (4,7%) de forma aislada. Por último, sólo un laboratorio (0,4%) realizó un estudio de secuenciación para su identificación.

Tabla 2. Métodos utilizados en la identificación.

Método	Número	%
Comercial	198	83,5
Comercial + Espectrometría de masas	17	7,2
Espectrometría de masas	11	4,7
Manual + comercial	6	2,5
Manual	2	0,9
Manual + aglutinación	1	0,4
Manual + secuenciación	1	0,4
No informa	1	0,4
Total	237	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. Los más empleados fueron el Microscan (105 centros) y el Vitek 2 (81 centros), seguidos del MALDI-TOF (28 centros), del Wider (15) y de la galería API 20 E (10).

Tabla 3. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Método comercial	Número	% uso	% acierto
Microscan	105	42,2	98,0

Vitek 2	81	32,6	100,0
Maldi-Tof	28	11,2	100,0
Wider	15	6,0	93,4
Galerías API			
API 20 E	10	4,0	90,0
ID 32 GN	1	0,4	100,0
Phoenix	4	1,6	100,0
BBL Crystal	1	0,4	100,0
RapID ONE System	1	0,4	0,0
Sensititre	1	0,4	100,0
No especifica el sistema utilizado	2	0,8	100,0
Total	249	100,0	94,2

La mayoría de los sistemas comerciales identificaron correctamente la cepa de *E. cloacae*, Vitek-2 y Maldi-Tof con un 100% de aciertos, seguidos por Microscan (98,0% de aciertos), Wider (93,4%) y la galería API 20 E (90,0%). También hay que matizar que, en el caso del Microscan, los dos centros que fallaron en la identificación fue debido a una confusión con la cepa problema (la cepa de *S. schleiferi* pertenecía al control BX-Diciembre/13, mientras que la cepa de *E. faecalis* pertenecía al control BX-Enero/14). Respecto a la galería RapID ONE System, fue usada por un único centro que informó *E. aerogenes*, por lo que este dato se tienen que interpretar con precaución.

Tabla 4. Resultados de identificación de *E. cloacae* con los sistemas mayoritarios.

Sistema	Número usuarios	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. schleiferi</i>
Microscan	105	103 (98,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (1,0)	1 (1,0)
Vitek 2	81	81 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Maldi-Tof	28	28 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Wider	15	14 (93,4)	1 (6,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
API 20 E	10	9 (90,0)	0 (0,0)	1 (10,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

GENERALIDADES

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a los 234 centros que realizaron una identificación mínima de género *Enterobacter* (incluyendo el participante que informó *E. sakazakii*, que actualmente pertenece al género *Cronobacter*). Uno de los 234 participantes no realizó el estudio de sensibilidad, con lo que se analizaron un total de 233 antibiogramas. El número de participantes que determinó la CMI mediante una técnica automatizada de microdilución en caldo fue de 220 (94,4%), empleándose como método único en el 67,8% de los casos. Fueron 62 (26,6%) los centros que realizaron una técnica de difusión en disco-placa, de los que 10 (4,3%) lo hicieron de forma única. Se realizó E-test® en 27 laboratorios (11,6%), en todos los casos 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	158	67,8
CMI + disco-placa	37	15,9
CMI + disco-placa + E-test®	13	5,6
CMI + E-test®	12	5,2
Disco-placa	10	4,3
Disco-placa + E-test®	2	0,8
No especificado	1	0,4
Total	233	100,0

Sobre un total de 220 respuestas, los equipos más utilizados para la realización del antibiograma mediante microdilución fueron los sistemas automatizados Microscan (50,9%) y Vitek 2 (38,2%), seguidos del Wider (6,4%). Los datos se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Marcas empleadas en el antibiograma.

Marca	Número	%
Microscan	112	50,9
Vitek 2	84	38,2
Wider	14	6,4
Phoenix	5	2,3
Sensititre	4	1,8
Preparación propia	1	0,4

Total 220 100,0

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 empleando los criterios del EUCAST y del CLSI correspondientes a la familia *Enterobacteriaceae* para la interpretación de los resultados.

Se realizó, además, la detección de BLEE mediante la prueba de sinergia de doble disco entre cefalosporinas de tercera y cuarta generación y la asociación amoxicilina-ácido clavulánico, resultando positiva. Mediante PCR se caracterizó la BLEE como CTX-M-9 tipo. Asimismo, se descartaron la presencia de carbapenemasas de clase A (GES, IMI, NMC, Sme, KPC y GIM), de clase B (IMP, KHM, NDM, SPM y VIM) y de clase D (OXA-48), así como la presencia de AmpC plasmídicas (ACC, CIT, DHA, EBC, FOX y MOX).

Tabla 7. Sensibilidad antibiótica de la cepa.

Antibiótico	CMI ^a (µg/mL)	Interpretación ^b
Piperacilina-tazobactam	≤8/4	S
Cefotaxima	8	R
Ceftazidima	1	S
Cefepima	≤1	S
Aztreonam	≤1	S
Imipenem	≤1	S
Meropenem	≤1	S
Ertapenem	≤0,25	S
Gentamicina	≤1	S
Tobramicina	≤2	S
Amikacina	≤4	S
Ciprofloxacino	0,5	S
Cotrimoxazol	>4/76	R
Fosfomicina	≤32	S
Tigeciclina	≤0,5	S

^aCMI: concentración mínima inhibitoria.

^bS: sensible; R: resistente.

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
Ampicilina/amoxicilina	Ampicilina/amoxicilina	Ampicilina/amoxicilina
Amoxicilina-clavulanato	Amoxicilina-clavulanato	Amoxicilina-clavulanato
Cefuroxima	Cefuroxima	Cefuroxima
Cefotaxima/ceftriaxona	Cefotaxima/ceftriaxona	Cefotaxima/ceftriaxona
Ceftazidima	Ceftazidima	
Cefepima	Cefepima	Cefepima
Aztreonam	Aztreonam	Aztreonam
Piperacilina-tazobactam	Piperacilina-tazobactam	Piperacilina-tazobactam
Imipenem	Imipenem	Imipenem
Meropenem	Meropenem	Meropenem
Ertapenem	Ertapenem	Ertapenem
Cotrimoxazol		Cotrimoxazol
Ciprofloxacino	Ciprofloxacino	Ciprofloxacino
Levofloxacino	Levofloxacino	
Gentamicina		Gentamicina
Tobramicina	Tobramicina	Tobramicina
Amikacina	Amikacina	Amikacina
Colistina		
Tigeciclina		Tigeciclina

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: ampicilina, amoxicilina-clavulanato, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, cefepima, imipenem, gentamicina, tobramicina, amikacina, ciprofloxacino 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 233 laboratorios que realizaron antibiograma con la identificación mínima de género *Enterobacteriaceae*, 167 (71,7%) utilizaron los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*), otros 62 (26,6%) los del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), 3 (1,3%) según la bibliografía, mientras que el laboratorio restante (0,4%) envió la cepa a su laboratorio de referencia y no disponía de esa información (tabla 9).

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

Marca	Número	%
CLSI	167	71,7
EUCAST	62	26,6
Bibliografía	3	1,3
Antibiograma realizado en centro referencia	1	0,4
Total	233	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 40 antibióticos diferentes.

Tabla 10. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos.

Antibiótico	Número	Interpretación ^a			
		Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta
Ampicilina/amoxicilina	148	–	–	148 (100,0)	–
Amoxicilina-clavulanato	194	3 (1,5)	–	191 (98,5)	–
Piperacilina-tazobactam	150	133 (88,7)	4 (2,7)	13 (8,6)	–
Aztreonam	76	11 (14,5)	25 (32,9)	40 (52,6)	–
Cefalotina	55	–	–	55 (100,0)	–
Cefuroxima	104	1 (1,0)	–	102 (98,0)	1 (1,0)
Cefoxitina	101	–	–	101 (100,0)	–
Cefotaxima	206	7 (3,4)	4 (1,9)	195 (94,7)	–
Ceftazidima	145	71 (49,0)	18 (12,4)	55 (37,9)	1 (0,7)
Cefepima	177	71 (40,1)	18 (10,2)	87 (49,2)	1 (0,5)
Ertapenem	121	111 (91,7)	3 (2,5)	7 (5,8)	–
Imipenem	203	179 (88,2)	17 (8,4)	7 (3,4)	–
Meropenem	35	34 (97,1)	–	1 (2,9)	–
Gentamicina	199	144 (72,4)	30 (15,1)	25 (12,5)	–
Tobramicina	78	51 (65,4)	15 (19,2)	12 (15,4)	–
Amikacina	160	154 (96,3)	5 (3,1)	1 (0,6)	–
Ciprofloxacino	221	215 (97,2)	3 (1,4)	3 (1,4)	–
Cotrimoxazol	116	7 (6,0)	–	108 (93,1)	1 (0,9)
Tigeciclina	53	30 (56,6)	20 (37,7)	3 (5,7)	–

^aLos 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, con las excepciones de la ceftazidima, la cefepima y el aztreonam. Ello se debe a que el laboratorio de referencia ha aplicado estrictamente los criterios del EUCAST y del CLSI; esto es, interpretar cada antibiótico en base a la CMI, independientemente del mecanismo de resistencia de la cepa. Sin embargo, otros muchos centros han preferido informar todas las cefalosporinas de 3ª y 4ª generación y el aztreonam como resistentes, al ser una cepa productora de BLEE.

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 asociada a ventilación mecánica, era productora de BLEE. Dicho objetivo se justificaba por la creciente frecuencia de aislamiento de cepas de *E. cloacae* productoras de BLEE en nuestro país y la dificultad de detectar la producción de BLEE en esta especie. Ello se debe a que las cepas de *E. cloacae* poseen una β -lactamasa cromosómica de tipo AmpC que confiere resistencia intrínseca a la ampicilina, a la amoxicilina-clavulanato y a

todas las cefalosporinas de 1ª y 2ª generación. En ocasiones esta enzima AmpC puede estar desreprimida, habiendo una hiperproducción de la misma que afectaría a las cefalosporinas de 3ª generación. Es importante que los laboratorios de Microbiología sean capaces de diferenciar esta hiperproducción de AmpC de la adquisición exógena de BLEE, ya que esta última conlleva además medidas de aislamiento al paciente.

Así, en este control, solamente un 55,0% de los participantes han indicado de forma explícita la producción de BLEE en la cepa de *E. cloacae* remitida (tabla 11). Este porcentaje es inferior al de la cepa de *Salmonella enterica* remitida en el control B-1/12, en el que entonces un 70,2% comentaron explícitamente la producción de BLEE; y también inferior al control mensual de agosto 2011, en el que el 89% de los laboratorios informaron de esta característica es una cepa de *Klebsiella pneumoniae*. Ello pone de manifiesto, como ya se ha comentado, la dificultad de diferenciar en cepas del género *Enterobacter* la producción de BLEE de la hiperproducción de AmpC, a diferencia de otras especies como *Escherichia coli* o *K. pneumoniae*. Asimismo, un factor adicional es que algunos centros pequeños carecen de algunos discos de antibióticos (cefepima) necesarios para realizar prueba de sinergia con amoxicilina-clavulanato.

Tabla 11. Resultados de la detección de la producción de BLEE.

Característica especial	Número	%
Cepa productora de BLEE	128	55,0
Cepa hiperproductora de AmpC	22	9,4
Sin información específica	83	35,6
Total	233	100,0

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: 231 laboratorios (97,4%) afirmaron no haberlo utilizado, 3 centros (1,3%) declararon haberlo requerido y 3 centros (1,3%) lo utilizaron parcialmente.

COMENTARIOS

Como se ha señalado anteriormente, muchos participantes (128 centros) comentaron que se trataba de una cepa productora de BLEE o bien, hiperproductora de AmpC (22). Otros comentarios mayoritarios fueron acerca de recomendaciones terapéuticas (25 centros), principalmente el tratamiento con un carbapenémico (algunos participantes recomendaban asociarlo a otro antimicrobiano). Diez centros desaconsejaban el tratamiento con aztreonam y cefalosporinas de 4ª generación en cepas de *E. cloacae* productoras de BLEE, por lo que señalaron explícitamente que, a pesar de las recomendaciones del CLSI y del EUCAST que se basan en la CMI, informaron estos antimicrobianos como resistentes.

Algunos participantes (6) recomendaron el aislamiento del paciente. Por último, cinco participantes realizaron la prueba de Hodge con resultado negativo y otro laboratorio obtuvo un resultado positivo en esta prueba.