

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE BACTERIOLOGÍA CONTROL B-2/18

En el Análisis de Resultados del presente control se comentan los resultados obtenidos en el estudio bacteriológico de la muestra enviada para control externo. Se trató de un líofilo preparado por el Programa de Control de Calidad Externo SEIMC (Programa CCS) a partir de una cepa bacteriana de reserva que había sido debidamente almacenada y, cuyo estudio, fue realizado por laboratorios externos expertos que actuaron de referencia para el Programa CCS. Además, se confirmó la homogeneidad y estabilidad de las muestras a través de ensayos realizados tras la preparación de los líofilos y tras su envío, asegurando así la validez de las mismas.

El valor asignado se determinó a partir del consenso de resultados (coincidencia de resultados) aportados por dos laboratorios expertos, que emplearon métodos con sensibilidad y especificidad adecuadas para cada determinación. Además, la identificación fue refrendada mediante estudio de secuenciación. Estos laboratorios expertos colaboran con el Programa CCS mediante la firma de acuerdos.

Este Análisis de Resultados ha sido elaborado por especialistas en Microbiología y Parasitología.

La confidencialidad de todos los resultados está asegurada a través de la firma de compromisos de confidencialidad por parte de todo el personal del Programa CCS y de sus colaboradores.

INTRODUCCIÓN

En el presente control se envió a los participantes un producto liofilizado con una única cepa. La historia clínica correspondía a la de un paciente de 89 años, portador de una sonda urinaria permanente. Como antecedentes de interés, el paciente presentaba una prostatitis crónica e hipertrofia benigna de próstata con obstrucción secundaria de vía urinaria. Fue llevado a puertas de Urgencias de su hospital de área por presentar un cuadro de 48 horas de evolución con deterioro de su estado general, fiebre no termometrada y desorientación témporo-espacial. A la exploración, presentaba regular estado general, palidez muco-cutánea y taquipnea. La temperatura era de 38,4°C. El sedimento de orina indicaba existencia de leucocituria y bacteriuria intensa. Se tomó una muestra de orina y dos muestras de hemocultivos que fueron remitidos al Servicio de Microbiología para cultivo bacteriológico, aislándose en todas las muestras, a las 24 horas de incubación, la bacteria que era objeto de este control.

Se solicitó a los participantes la **identificación** y el **estudio de sensibilidad** de la cepa remitida. Así mismo, podían hacerse los **comentarios** microbiológicos, clínicos, terapéuticos, etc. que se estimasen oportunos.

VALOR ASIGNADO

La cepa fue identificada como *Citrobacter freundii/braakii/murlinae* (valor asignado de referencia y empleado para el estudio comparativo). Esta identificación se realizó mediante espectrometría de masas Maldi-Tof (Bruker) y por secuenciación del rDNA 16S. Dada la cercanía genética entre las especies, se aceptan como óptimos dichos resultados, puesto que los resultados obtenidos por secuenciación y por espectrometría de masas son muy similares.

Los resultados de sensibilidad antibiótica de referencia fueron obtenidos mediante microdilución en caldo (panel ENN2F de Sensititre®, Thermo Scientific) y se muestran en la tabla 1. 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. Se emplearon los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) y del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) correspondientes a la familia *Enterobacteriaceae* para la interpretación de los resultados.

Tabla 1. Valor asignado del estudio de sensibilidad.

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Categorización ^a	
		CLSI	EUCAST
Ampicilina	>16	R	R
Amoxicilina / clavulanato	>16/8	R	NI
Piperacilina / tazobactam	≤8/4	S	NI
Cefotaxima	≤0,5	S	S
Ceftazidima	1	S	S
Cefepima	≤1	S	S
Imipenem	≤1	S	S
Meropenem	≤1	S	S
Gentamicina	≤1	S	S
Tobramicina	≤2	S	S
Amikacina	≤4	S	S
Ciprofloxacino	≤0,12	S	S
Cotrimoxazol	≤2/38	S	S

^aS: sensible, R: resistente, NI: no interpretada.

En la tabla 1 no se incluye la categorización de las combinaciones de β-lactámicos con inhibidores según EUCAST, ya que el método empleado para la obtención de las CMIs utiliza una concentración variable de inhibidor.

PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 228 centros inscritos en Bacteriología, de los que 222 remitieron hoja de respuesta, todos ellos con respuestas valorables. Así, el porcentaje de participación fue del 97,4%, similar al del último control (96,1%).

IDENTIFICACIÓN

El Programa de Control de Calidad SEIMC consideró como respuesta óptima *Citrobacter freundii/braakii/murlinae* o complejo *C. freundii*, que incluye dichas especies, ya que estas son muy similares genéticamente y difíciles de diferenciar tanto por métodos proteómicos como moleculares.

Como se puede observar en la tabla 2, algo más de la mitad de los participantes (116, el 52,3%) informaron la especie *C. freundii*, mientras que hubo 58 centros (26,1%) que informaron la especie *C. braakii*, y otros 43 centros (19,4%) respondieron el complejo *C. freundii*, por lo que el porcentaje de respuestas válidas alcanzó el 97,7%.

Tabla 2. Resultados de la identificación bacteriana.

Identificación	Número	%
<i>Citrobacter freundii</i>	116	52,3
<i>Citrobacter braakii</i>	58	26,1
<i>Citrobacter freundii</i> complex	43	19,4
<i>Escherichia coli</i>	3	1,4
<i>Pasteurella multocida</i>	1	0,4
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0,4
Total	222	100,0

MÉTODOS Y MARCAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN

En este control, el 66,2% de los centros (147) emplearon técnicas comerciales para identificar la cepa, de los que 125 (56,3%) las usaron como único método. Respecto a la espectrometría de masas, fue informada por el 42,8% de los participantes (95 centros), siendo empleada como único método diagnóstico en el 32,0% de las ocasiones. Las pruebas manuales sólo fueron usadas por 9 laboratorios (4,1%), mientras que únicamente un laboratorio (0,4%) identificó la cepa mediante un estudio de secuenciación. Todos estos datos se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados en la identificación.

Método	Número	%
Comercial	116	52,3
Espectrometría de masas	71	32,0
Comercial + espectrometría de masas	23	10,3
Manual + comercial	5	2,3
Manual	3	1,4
Comercial + inmunocromatografía	2	0,9
Manual + comercial + espectrometría de masas	1	0,4

Secuenciación	1	0,4
Total	222	100,0

Los sistemas comerciales utilizados para la identificación se muestran en la tabla 4. Los más empleados fueron los paneles MicroScan de Beckman Coulter (64 centros), seguido del MALDI-TOF de Bruker (60 centros) y de las tarjetas VITEK® 2 de bioMérieux (48 centros), obteniendo todos ellos un alto índice de aciertos.

Tabla 4. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Marca comercial	Número	% uso	% acierto
MicroScan (Beckman Coulter)	64	29,4	96,9
MALDI-TOF (Bruker)	60	27,6	100,0
VITEK® 2 (bioMérieux)	48	22,0	100,0
MALDI-TOF (VITEK® MS)	27	12,4	100,0
Phoenix™ (Becton Dickinson)	6	2,8	83,3
Wider® (Soria Melguizo)	6	2,8	83,3
API® 20 E (bioMérieux)	4	1,8	100,0
BBL™ Crystal™ (Becton Dickinson)	1	0,4	100,0
RapID 20E (bioMérieux)	1	0,4	100,0
No especifica	1	0,4	100,0
Total	218	100,0	98,2

La capacidad de los sistemas comerciales empleados mayoritariamente para identificar la cepa se resume en la tabla 5. Todos ellos obtuvieron un porcentaje de aciertos elevado para la identificación de *C. freundii* / *C. braakii*, con algunos errores ocasionales.

Tabla 5. Resultados de identificación de *C. freundii* / *C. braakii* con los sistemas comerciales más empleados.

Sistema	Número	<i>C. freundii</i>	<i>C. braakii</i>	<i>C. freundii</i> complex	<i>E. coli</i>	<i>P.</i> <i>multocida</i>
MicroScan	64	35 (5,7)	7 (11,0)	20 (31,3)	1 (1,5)	1 (1,5)
MALDI-TOF (Bruker)	60	42 (70,0)	6 (10,0)	12 (20,0)	0	0
VITEK® 2 (bioMérieux)	48	21 (43,8)	24 (50,0)	3 (6,2)	0	0
MALDI-TOF (VITEK® MS)	27	10 (37,0)	13 (48,2)	4 (14,8)	0	0

Phoenix™	6	1 (16,7)	3 (50,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	0
Wider®	6	4 (66,6)	0	1 (16,7)	1 (16,7)	0
API® 20 E	4	0	4 (100,0)	0	0	0

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

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a los 217 centros que realizaron una identificación de complejo *C. freundii* o de cualquiera de las especies que componen dicho complejo. De ellos, dos no realizaron el estudio de sensibilidad, con lo que se analizaron un total de 215 antibiogramas. El número de participantes que determinó la CMI mediante una técnica automatizada de microdilución en caldo fue de 205 (95,3%), empleándose como método único en el 86,0% de los casos. Hubo 30 laboratorios que realizaron una técnica de difusión en disco-placa (14,0%), de los que 9 (4,2%) lo hicieron de forma única. Por último, fueron solamente 4 (1,9%) los centros que emplearon las tiras de gradiente de concentración, en todos los casos combinadas con otro método. Todos estos datos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Métodos empleados en el antibiograma.

Método	Número	%
Microdilución	185	86,0
Microdilución + disco-placa	17	7,9
Disco-placa	9	4,2
Microdilución + disco-placa + tiras de gradiente de concentración	3	1,4
Disco-placa + tiras de gradiente de concentración	1	0,5
Total	215	100,0

Los sistemas más utilizados para la obtención de la CMI mediante el método de microdilución fueron los paneles de MicroScan (56,3%), seguidos de las tarjetas VITEK® 2 (36,4%). El conjunto de las marcas que se emplearon se detalla en la tabla 7.

Tabla 7. Marcas empleadas en el antibiograma

Marca	Número	%
MicroScan (Beckman Coulter)	116	56,3
VITEK® 2 (bioMérieux)	75	36,4

Phoenix™ (Becton Dickinson)	8	3,9
Wider® (Soria Melguizo)	6	2,9
Preparación propia	1	0,5
Total	206	100,0

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS DE LOS PARTICIPANTES

Se solicitó a los participantes que categorizaran tal cual el valor obtenido en el antibiograma (halo de inhibición o CMI) y, en el caso de que quisieran realizar una lectura interpretada de los resultados obtenidos para algunos antibióticos que no se correspondiera con el patrón de resistencia intrínseca del microorganismo estudiado, que ésta la consignaran en el apartado de comentarios y no en la tabla de respuesta.

Así, de los 215 laboratorios que realizaron antibiograma con las identificaciones valorables, 145 (67,5%) utilizaron los criterios del EUCAST, mientras que los 70 restantes (32,5%) se basaron en los criterios del CLSI (tabla 8).

Tabla 8. Criterios seguidos para la interpretación de los resultados.

Marca	Número	%
EUCAST	145	67,4
CLSI	70	32,6
Total	215	100,0

En la tabla 9 se resumen los resultados de las pruebas cualitativas de sensibilidad cuando el número de respuestas para un determinado antibiótico fue igual o superior a 30. En total, se han recibido resultados correspondientes a 36 antibióticos diferentes, pero tan sólo 22 fueron informados por 30 o más participantes.

Los antibióticos informados por los participantes para los que no se dispone de valor asignado no son evaluados por parte del Programa CCS, por lo que aparecen en este AR sólo a modo informativo, sin efectos de comparación.

En el estudio de sensibilidad, el Programa CCS considera como resultados **NO aceptables**, los **errores máximos** de categorización (resultado obtenido en la categoría de sensible siendo el valor asignado resistente).

Tabla 9. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos.

Antibiótico	Nº	Categorización ^a			
		Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta
Ampicilina	153	2 (1,3)	0	151 (98,7)	0
Amoxicilina-clavulanato	186	1 (0,5)	1 (0,5)	184 (99,0)	0

Piperacilina-tazobactam	130	125 (96,2)	1 (0,7)	4 (3,1)	0
Cefalotina / cefazolina	35	0	0	35 (1000)	0
Cefuroxima	113	57 (50,4)	2 (1,8)	54 (47,8)	0
Cefoxitina	86	1 (1,2)	0	85 (98,8)	0
Cefotaxima	171	161 (94,1)	2 (1,2)	6 (3,5)	2 (1,2)
Ceftazidima	88	79 (89,8)	2 (2,3)	6 (6,8)	1 (1,1)
Cefepima	98	97 (99,0)	0	1 (1,0)	0
Ertapenema	113	112 (99,1)	0	0	1 (0,9)
Imipenema	159	159 (100,0)	0	0	0
Meropenema	52	52 (100,0)	0	0	0
Gentamicina	197	197 (100,0)	0	0	0
Tobramicina	79	79 (100,0)	0	0	0
Amikacina	92	92 (100,0)	0	0	0
Ácido nalidíxico	31	31 (100,0)	0	0	0
Ciprofloxacino	204	203 (99,5)	0	0	1 (0,5)
Levofloxacino	38	38 (100,0)	0	0	0
Cotrimoxazol	161	161 (100,0)	0	0	0
Tigeciclina	40	40 (100,0)	0	0	0
Nitrofurantoína	49	47 (96,0)	1 (2,0)	0	1 (2,0)
Fosfomicina	80	80 (100,0)	0	0	0

^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 algunos errores anecdóticos. Sin embargo, en el caso de la cefuroxima, no incluida en el antibiograma de consenso, se observó una importante discrepancia entre los diferentes centros. Ello se debe a que *C. freundii* presenta de forma natural una β -lactamasa cromosómica AmpC inducible, que confiere resistencia intrínseca a la ampicilina, amoxicilina-clavulanato y a las cefalosporinas de 1ª generación. Con respecto a la cefuroxima, puede ser sensible o presentar una resistencia intermedia, por lo que muchos centros han interpretado la cefuroxima como resistente.

UTILIZACIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO

Respecto a la necesidad de utilizar un laboratorio externo para la identificación de la cepa o para el estudio de sensibilidad, de los 222 participantes que enviaron hoja de respuesta con datos analizables se obtuvieron los

siguientes datos: 219 laboratorios (98,6%) afirmaron no haberlo utilizado, 1 centro (0,5%) declaró haberlo requerido y otros 2 centros (0,9%) lo utilizaron parcialmente.

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

El comentario mayoritario (56 centros) se refería a que *C. freundii* presentaba de forma natural una β -lactamasa AmpC cromosómica inducible, por lo que interpretaron la ampicilina, amoxicilina-clavulánico y algunos también la cefuroxima como resistentes. Así mismo, añadían que no estaba recomendado el tratamiento en monoterapia con cefalosporinas de 3ª generación o aztreonam por el desarrollo de resistencias. Las recomendaciones terapéuticas mayoritarias (8 centros) fueron el tratamiento con una carbapenema, o bien, con una fluoroquinolona.

Otros comentarios realizados por algunos participantes se resumen a continuación. Seis centros comentaron que su sistema de identificación (pruebas bioquímicas o MALDI-TOF) ofrecía una baja discriminación entre *C. freundii* y *C. braakii*. Cinco centros comentaron que el patrón de resistencia de la cepa era el propio de una cepa salvaje de *C. freundii* (5 centros). Cuatro centros visualizaron subpoblaciones más resistentes en el antibiograma. Cuatro centros recomendaron el cambio de la sonda urinaria en el paciente. Tres centros comentaron que la cepa era portadora de BLEE. Y por último tres centros que efectuaron el MALDI-TOF de VITEK-MS obtuvieron la especie *Citrobacter werkmanii*.

Madrid, 19 de Septiembre de 2018



C/ Agustín de Betancourt, 13
Entreplanta - 28003 Madrid
NIF: G-78387057

Concepción Gimeno Cardona

Coordinadora del Programa de Control de Calidad SEIMC

Nota: todos los comentarios o sugerencias generales, clínicas, microbiológicas o terapéuticas que los participantes han considerado oportuno indicar no son objeto de evaluación por parte del Programa CCS, por lo que este aspecto está fuera del alcance de la acreditación por ENAC.

Nota: las actividades subcontratadas por el Programa CCS son el transporte de las muestras, el valor asignado (consenso de expertos), y los estudios de homogeneidad y estabilidad de las muestras provenientes de cada uno de los lotes, siguiendo una estricta programación de tareas. Si en un determinado momento se necesita subcontratar otras actividades diferentes a las indicadas se informará debidamente.

Cumpliendo con los requerimientos de la norma ISO 17043, las actividades subcontratadas que afectan al valor asignado y a los estudios de homogeneidad son realizadas por colaboradores externos, acreditados por la norma ISO 15189 o evaluados previamente por el Programa CCS según los criterios de la norma ISO 15189.

Nota: si los datos anteriores son incorrectos o consideran oportuno apelar los resultados, rogamos se dirijan a la Secretaría del Programa CCS.