

## ANÁLISIS DE RESULTADOS DE BACTERIOLOGÍA CONTROL B-2/15

### INTRODUCCIÓN

En el presente control se envió a los participantes un producto liofilizado con una única cepa identificada por el laboratorio de referencia como *Clostridium subterminale*. La identificación de referencia se realizó mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), y fue confirmada por secuenciación del ARN ribosómico 16S. La historia clínica correspondía a un paciente varón de 69 años de edad, diabético e hipertenso, que era intervenido quirúrgicamente por una neoplasia rectal. A las 72 horas de la operación, el paciente sufrió un empeoramiento súbito de su estado, con malestar general, taquipnea, elevación de la temperatura corporal y dolor intenso en la zona de herida quirúrgica. A la exploración y tras la retirada del vendaje se observaba una amplia zona de edema y enrojecimiento alrededor de la herida, con aumento del calor local y presencia de exudado purulento y maloliente. El paciente presentaba mal estado general, se encontraba hipotenso con fiebre de 39,5°C y taquipnea. Se realizó limpieza y desbridamiento de la herida y se tomaron muestras de exudado que se remitieron al Servicio de Microbiología para cultivo bacteriológico, instaurándose cobertura antibiótica de amplio espectro. La tinción de Gram mostró la presencia de bacilos gramnegativos, bacilos grampositivos y cocos grampositivos formando tétradas. A las 48 h de incubación, se objetivó el crecimiento, entre otros, del microorganismo que fue 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. El objetivo principal de este control fue evidenciar la capacidad de los participantes para detectar e identificar *C. subterminale* en la muestra problema incubando las placas en atmósfera anaerobia.

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La cepa problema fue enviada a los 237 centros inscritos en Bacteriología, de los que 221 remitieron hoja de respuesta, lo que supone un porcentaje de participación del 93,2%, porcentaje moderadamente inferior al del último control (97,1%). En tres ocasiones, tras la siembra de la muestra, no se obtuvo crecimiento (1,4%), lo que se podría explicar presumiblemente por la no incubación de las placas en atmósfera de anaerobiosis. Así, hubo 218 respuestas analizables, con lo que el porcentaje real de participación fue del 92,0%. El Programa de Control de Calidad SEIMC consideró como respuesta óptima la identificación correcta de género y especie (*C. subterminale*), y como respuesta aceptable la identificación mínima de género *Clostridium*.

Como se puede observar en la tabla 1 hubo una amplia variedad de identificaciones. Aproximadamente la mitad de los centros (52,5%) identificaron correctamente el género y la especie de la cepa control, mientras que un 12,2% informaron género *Clostridium*, y otro 23,5% otra especie perteneciente a dicho género. Así, un 88,2% de los participantes encuadraron correctamente la cepa dentro del género *Clostridium*. Hay que señalar que algunos resultados discrepantes se trataban de "errores pre o post-analíticos", ya que las identificaciones eran compatibles con las de otro control del área de Bacteriología Mensual que se remitió al mismo tiempo (*Yersinia enterocolitica*, BX-julio-15, y *Staphylococcus aureus*, BX-agosto-15).

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

Identificación	Número	%
<i>Clostridium subterminale</i>	116	52,5
Género <i>Clostridium</i>	27	12,2
<i>Clostridium histolyticum</i>	15	6,8
<i>Clostridium perfringens</i>	9	4,0

<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	9	4,0
<i>Clostridium butyricum</i>	5	2,2
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	4	1,8
<i>Porphyromonas asaccharolitica</i>	3	1,3
<i>Clostridium beijerinckii</i>	2	0,8
<i>Clostridium bifermentans</i>	2	0,8
<i>Clostridium difficile</i>	2	0,8
<i>Clostridium septicum</i>	2	0,8
<i>Fusobacterium varium</i>	2	0,8
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	0,8
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1	0,5
Bacilo anaerobio	1	0,5
Bacilo gramnegativo anaerobio	1	0,5
Bacilo grampositivo	1	0,5
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	0,5
<i>Clostridium argentinense</i>	1	0,5
<i>Clostridium clostridioforme</i>	1	0,5
<i>Clostridium innocuum</i>	1	0,5
<i>Clostridium ramosum</i>	1	0,5
<i>Clostridium sordellii</i>	1	0,5
<i>Clostridium sporogenes</i>	1	0,5
<i>Eggerthella lenta</i>	1	0,5
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0,5
<i>Fingoldia magna</i>	1	0,5
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0,5
<i>Staphylococcus hominis</i>	1	0,5
<i>Tissierella praeacuta</i>	1	0,5
No crecimiento bacteriano	3	1,3
<b>Total</b>	<b>221</b>	<b>100,0</b>

En este control, el 69,7% de los centros (152), emplearon técnicas comerciales para identificar la cepa. De ellos, 118 (54,1%) las usaron como único método. Respecto a la espectrometría de masas, fue informada por 72 participantes (33,0%), siendo empleada como único método diagnóstico en el 24,3% de las ocasiones. Las pruebas manuales, fueron usadas por 21 laboratorios (9,6%), en 7 de ellos (3,2%) de forma única. Por último, 9 laboratorios (4,1%) realizaron un estudio de secuenciación para la identificación de la cepa (tabla 2).

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

<b>Método</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
Comercial	118	54,1
Espectrometría de masas	53	24,3

Comercial + espectrometría de masas	13	5,9
Manual + comercial	12	5,5
Manual	7	3,2
Comercial + secuenciación	3	1,4
Comercial + secuenciación + espectrometría de masas	3	1,4
Secuenciación	3	1,4
Manual + comercial + espectrometría de masas	2	0,9
Comercial + inmunocromatografía	1	0,5
Espectrometría de masas + aglutinación	1	0,5
No informa	2	0,9
<b>Total</b>	<b>218</b>	<b>100,0</b>

Los sistemas comerciales utilizados se muestran en la tabla 3. Se han excluido de la tabla los dos centros que informaron *Yersinia enterocolitica* así como los otros dos laboratorios que respondieron *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus hominis* por tratarse de errores no relacionados con la fase analítica, considerándose respuestas cruzadas con este control. Los sistemas más empleados fueron el Maldi-TOF (71 centros, agrupando Bruker y Vitek MS), seguido del Vitek 2 de bioMérieux (58 centros) y de las galerías bioquímicas de bioMérieux API 20A (38 centros) y rapid ID 32A (29 centros).

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

Método comercial	Número	% uso	% acierto
MALDI-TOF (Bruker/Vitek MS)	71	32,3	77,5
Galerías API (bioMérieux)			
API 20A	38	17,3	18,4
Rapid ID 32A	29	13,2	62,1
API no especificado	4	1,8	25,0
Vitek 2 (bioMérieux)	58	26,4	56,9
Microscan (Beckman Coulter)	6	2,7	50,0
RapID ANA II System (Remel)	4	1,8	75,0
BBL Crystal (Becton Dickinson)	3	1,4	0,0
No especifica	7	3,1	85,7
<b>Total</b>	<b>220</b>	<b>100,0</b>	<b>56,4</b>

La capacidad de los sistemas comerciales mayoritarios para identificar la cepa se resume en la tabla 4. Los mejores resultados se obtuvieron con el MALDI-TOF (77,5% de aciertos, agrupando Bruker y Vitek MS) seguido del RapID ANA II System (75,0%), este último empleado únicamente por 4 centros, por lo que este dato se ha de tomar con precaución. Respecto al MALDI-TOF, entre las identificaciones discrepantes destacan el 12,7% de los centros que respondieron *Clostridium tyrobutyricum* y el 4,2% de *Clostridium butyricum*; algunas de estas identificaciones discrepantes, según especificaron algunos participantes en comentarios, se obtuvieron con el Maldi-TOF de Vitek MS.

**Tabla 4. Resultados de identificación de *C. subterminale* con los sistemas mayoritarios.**

Sistema	Número usuarios	<i>C. subterminale</i>	<i>C. histolyticum</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>	Otras especies de <i>Clostridium</i> <sup>a</sup>	Otras especies diferentes de <i>Clostridium</i>
Maldi-Tof	71	55 (77,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (12,7)	6 (8,4)	1 (1,4)
Vitek 2	58	33 (56,9)	5 (8,6)	0 (0,0)	2 (3,4)	11 (19,0)	7 (12,1)
API 20A	38	7 (18,5)	4 (10,5)	3 (7,9)	0 (0,0)	20 (52,6)	4 (10,5)
Rapid ID 32A	29	18 (62,1)	4 (13,8)	3 (10,3)	0 (0,0)	3 (10,3)	1 (3,5)
Microscan	6	3 (50,0)	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)	2 (33,3)	0 (0,0)
RapID ANA II	4	3 (75,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (25,0)
BBL Crystal	3	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (66,7)

<sup>a</sup>Incluye género *Clostridium*.

## RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

### GENERALIDADES

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a los 195 centros que realizaron una identificación mínima de género *Clostridium*. De ellos, 42 no realizaron el estudio de sensibilidad, por lo que se analizaron un total de 153 antibiogramas. Fueron 76 (49,7%) los centros que realizaron E-test®, en 60 de ellos (39,3%) fue el único método empleado. Hubo 58 laboratorios que informaron una técnica de difusión en disco-placa (37,9%), de los que 41 (26,8%) lo hicieron de forma única. El número de participantes que realizaron el método de la concentración crítica fue de 24 (15,7%), mientras que 17 laboratorios (11,1%) determinaron la CMI mediante una técnica de microdilución en caldo (tabla 5).

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

Método	Número	%
E-test®	60	39,3
Disco-placa	41	26,8
Concentración crítica	22	14,4
CMI	11	7,2
Disco-placa + E-test®	11	7,2
CMI + disco-placa	3	2,0
CMI + disco-placa + E-test®	2	1,3
CMI + E-test®	1	0,6
Concentración crítica + disco-placa + E-test®	1	0,6
Concentración crítica + E-test®	1	0,6
Total	153	100,0

Sobre un total de 40 respuestas, los equipos más utilizados para la realización del antibiograma

mediante los métodos de microdilución y concentración crítica fueron el sistema automatizado ATB™ ANA (60,0%) seguido del Sensititre™ (15,0%). Estos datos se resumen en la tabla 6.

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

Marca	Número	%
ATB™ ANA (bioMérieux)	24	60,0
Sensititre™ (Thermo Scientific)	6	15,0
MicroScan (Beckman Coulter)	2	5,0
Vitek® 2 (bioMérieux)	1	2,5
Wider® (Soria Melguizo)	1	2,5
No especifica	6	15,0
Total	40	100,0

Los resultados de sensibilidad antibiótica de referencia fueron obtenidos mediante tiras de gradiente de concentración E-test® (bioMérieux) 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 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) y del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) correspondientes a los anaerobios grampositivos para la interpretación de los resultados.

**Tabla 7. Sensibilidad antibiótica de referencia.**

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Interpretación <sup>a</sup> (CLSI / EUCAST)
Penicilina G	0,125	S
Amoxicilina-clavulanato	0,094	S
Cefoxitina	12	S/-
Imipenem	0,125	S
Clindamicina	0,032	S
Metronidazol	0,094	S

<sup>a</sup>S: sensible. El guion (-) indica que no existen puntos de corte.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS

Se solicitó a los participantes que informasen qué criterios de puntos de corte utilizaron para la interpretación del antibiograma. De los 153 laboratorios que realizaron antibiograma con la identificación mínima de género *Clostridium*, 76 (49,7%) utilizaron los criterios del CLSI, otros 57 (37,3%) los del EUCAST y otros 14 (9,2%) según la bibliografía. Hubo 4 centros (2,6%) que se basaron en otros criterios: un centro utilizó los criterios de la BSAC (*British Society for Antimicrobial Chemotherapy*) junto con los del EUCAST, otro los criterios del CLSI y del EUCAST, otro los de la SFM (*Société Française de Microbiologie*), y otro según la ficha técnica del ATB™ ANA (bioMérieux). Por último, 2 centros (1,4%) no aportaron información al respecto (tabla 8).

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

Criterio	Número	%
CLSI	76	49,7

EUCAST	57	37,3
Bibliografía	14	9,2
BSAC+EUCAST	1	0,6
CLSI + EUCAST	1	0,6
SFM	1	0,6
Según ficha técnica ATB ANA	1	0,6
No informan	2	1,4
<b>Total</b>	<b>153</b>	<b>100,0</b>

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 34 antibióticos diferentes.

**Tabla 9. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos.**

Antibiótico	Número	Interpretación <sup>a</sup>			
		Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta
Penicilina	136	130 (95,6)	0	6 (4,4)	0
Amoxicilina-clavulanato	122	121 (99,2)	0	1 (0,8)	0
Piperacilina-tazobactam	75	73 (97,4)	0	1 (1,3)	1 (1,3)
Cefoxitina	71	68 (95,8)	0	2 (2,8)	1 (1,4)
Imipenem	112	109 (97,3)	0	2 (1,8)	1 (0,9)
Clindamicina	145	141 (97,2)	0	4 (2,8)	0
Metronidazol	139	136 (97,8)	0	3 (2,2)	0
Moxifloxacino	32	32 (100,0)	0	0	0
Vancomicina	54	50 (92,6)	0	3 (5,6)	1 (1,8)

<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 de referencia para todos los antibióticos.

#### 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, de los 218 participantes que enviaron hoja de respuesta con datos analizables se obtuvieron los siguientes datos: 201 (92,2%) afirmaron no haberlo utilizado, 6 (2,8%) declararon haberlo requerido y 11 (5,0%) lo utilizaron parcialmente.

## COMENTARIOS

Algunos centros (18) especificaron en sus comentarios especies bacterianas no creadas en la base de datos, o bien, que utilizaron tiras de gradiente de concentración de las marcas Liofilchem o E-test® bioMérieux. En relación a estos comentarios cabe confirmar que todos estos valores se han creado en la base de datos actual para que puedan estar disponibles en próximos controles.

Otros comentarios mayoritarios fueron acerca de las recomendaciones terapéuticas (8 centros), principalmente la asociación de penicilina y clindamicina. Algunos participantes (n=4) recomendaron, además, realizar un desbridamiento de la herida.

Cinco centros comentaron discrepancias en cuanto a la identificación con dos sistemas comerciales diferentes, entre Vitek 2 (*C. subterminale*) y el Maldi-TOF de ViteK MS (*C. tyrobutyricum*). Por último, otros cinco centros comentaron que observaron en el Gram esporas subterminales.

Madrid, 30 de enero de 2016

**El Coordinador del Programa de Control de Calidad SEIMC**

**Nota:** La asignación del valor de referencia ha sido subcontratada a laboratorios externos.

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