

CONTROL DE CALIDAD DE BACTERIOLOGÍA (B-2/04)

En el presente control se envió a los participantes un producto liofilizado con una única cepa caracterizada por el laboratorio de referencia como *Clostridium perfringens*. Se acompañaba de un supuesto clínico de un varón de 58 años de edad, diabético e hipertenso conocido, sin otros antecedentes patológicos de interés, que tras una caída casual presentó una herida abierta en la pierna derecha con gran destrucción tisular. El paciente acudió a su médico de familia pues, a las 72 h, comenzó a notar un fuerte dolor en la zona de la herida que iba aumentando progresivamente en intensidad, por lo que se retiró el vendaje, llamando la atención el mal aspecto de la misma. En el momento de la exploración se observó alrededor de la herida una piel edematosa de coloración pálida marmórea y un exudado serosanguinolento. El paciente presentaba fiebre de 38°C, malestar general y ligera taquicardia. Se realizó un desbridamiento de la herida y se tomó una muestra que fue enviada al laboratorio de microbiología para cultivo bacteriológico. La tinción de Gram reveló la presencia de bacilos grampositivos cortos y gruesos y, a las 48 h, se produjo el crecimiento de las colonias objeto del control.

Se solicitó a los participantes la identificación de la cepa y la realización del estudio de sensibilidad con los antimicrobianos que considerasen oportunos, así como la formulación de los comentarios libres sobre el significado clínico del aislado, la pauta de actuación a seguir, o cualquier otro tipo de comentario técnico.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La cepa problema fue enviada a 283 laboratorios de los que 248 remitieron la hoja de respuesta. El porcentaje de participación fue del 87,6%, inferior al de otros controles. Exceptuando las siete ocasiones en las que no se detectó crecimiento por haber sembrado la muestra únicamente en condiciones aerobias, una en la que no se realizó el cultivo por no disponer de condiciones de anaerobiosis, otra en la que no se informó el aislado a pesar de obtener crecimiento y realizar antibiograma y otra en la que se obtuvo el crecimiento de un contaminante no valorable, en el resto de ocasiones hubo crecimiento valorable por parte de los participantes, por lo que son analizables 238 respuestas. Se consideraron como válidas para el análisis de los resultados las 227 que identificaron la cepa como género *Clostridium* o *Clostridium perfringens* (95,4%). Como se puede observar en la tabla 1, la mayoría identificó correctamente el género y la especie (86,5%), aunque este porcentaje es inferior al de otros controles, posiblemente por una dificultad mayor en el procesamiento de la muestra. Las restantes identificaciones corresponden a 21 participantes que informaron género *Clostridium* (8,8%), a dos que identificaron *Clostridium beijerinckii* (0,8%), y a otros dos que identificaron género *Corynebacterium*. El resto de las identificaciones (tabla 1) se informaron por un solo participante (0,4%). Por otro lado, en una ocasión se obtuvo el crecimiento de una segunda bacteria en la muestra remitida, informándose además del *C. perfringrens* una *Stenotrophomonas maltophilia*, lo que el Control de Calidad ha interpretado como una posible contaminación durante el procesamiento de la muestra remitida.

Tabla 1. Resultados de la identificación bacteriana.

Identificación	Número	%
Clostridium perfringens	206	86,5
Género Clostridium	21	8,8
Clostridium beijerinckii	2	0,8
Género Corynebacterium	2	0,8
Citrobacter freundii	1	0,4
Género <i>Bacillus</i>	1	0,4
Clostridium tetani	1	0,4
Género Aureobacterium	1	0,4
Género Pseudomonas	1	0,4
Erysipelothrix rhusiopathiae	1	0,4
Escherichia coli	1	0,4
Total	238	100,0

En la identificación bacteriana, los métodos comerciales fueron utilizados por 180 participantes (75,6%) y de forma exclusiva por el 68,9%. Usaron métodos manuales 54 laboratorios (22,7%), el 16,0% como único método. El 8,4% de los centros no informó del método empleado. Los resultados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Métodos utilizados en la identificación.

Métodos	Número	%
Comercial	164	68,9
Manual	38	16,0
Manual + comercial	16	6,7
No informa del método empleado	20	8,4
Total	238	100,0

En la tabla 3 se especifican las marcas y sistemas comerciales utilizados para la identificación, siendo las más empleadas (77,2%) las galerías bioquímicas API (se utiliza una amplia miscelánea de ellas). Les sigue en frecuencia el sistema Vitek usado por 12 participantes (6,7%) y el sistema Microscan por 11 (6,1%). Ocho laboratorios (4,4%)



utilizaron el sistema Rapid Ana System II y en seis ocasiones (3,3%) el BBL Crystal. Un participante (0,6%) no especificó el sistema comercial utilizado para la identificación. El resto de las marcas fueron usadas en una sola ocasión y se detallan en la tabla 3. Respecto a las 11 identificaciones discordantes obtenidas, todas excepto una se obtuvieron con métodos comerciales; de ellas 2 se pueden considerar un fallo del sistema API 20A, que era el adecuado para realizar el diagnóstico, en ambos casos se informó *C. beijerinckii*. El resto son errores diagnósticos y se distribuyen de la siguiente manera: 3 con el API Coryne, 2 con el API 20E, 1 con el API Id 32E, 1 con el sistema Microscan y 1 que no especificó la marca. Las pruebas dell laboratorio de referencia para la identificación de la cepa se resumen en la tabla 4.

Tabla 3. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Método comercial	Número	%
Galerías API		
API 20A	72	40,0
Rapid Id 32A	43	23,9
API no especificado	15	8,3
API 20E	2	1,1
API ld 32E	1	0,6
API Coryne	4	2,2
API ATB	2	1,1
Vitek	12	6,7
Microscan	11	6,1
Rapid Ana System II	8	4,4
BBL Crystal	6	3,3
Mast Id Anaerobic	1	0,6
Sceptor	1	0,6
Microgen	1	0,6
No especifica el sistema utilizado	1	0,6
Total	180	100,0

Tabla 4. Pruebas de identificación de la cepa remitida para el control.

Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
Gram	BGP ^a	Actividad lipasa	_
Crecimiento en AS ^a en aerobiosis	_	Fermentación de glucosa	+
Indol	_	Fermentación maltosa	+
Actividad lecitinasa	+	Fermentación salicina	_
Movilidad	_	Fermentación lactosa	+
Catalasa	_	Fermentación manitol	_
Hidrólisis de gelatina	+	Fermentación sacarosa	+

^aAbreviaturas: BGP: bacilos grampositivos; AS: agar sangre.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS

GENERALIDADES

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a los centros que identificaron la bacteria como *C. perfringens* o género *Clostridium*. En 56 de las ocasiones no se realizó dicho estudio, esto puede ser debido a que no todos los laboratorios disponen de CMI para anaerobios y no existen criterios estandarizados para la técnica de difusión en disco-placa, por lo que el número de respuestas analizables fue de 171 (tabla 5). Como puede observarse, el 52,0% realizó CMI mediante técnica de microdilución (17 participantes), concentraciones críticas (26 participantes) y por E-test® (46 participantes), usándose como método único por 78 de los centros (45,6%). La técnica de difusión en discoplaca se utilizó en 85 laboratorios y de forma única en 74 (43,3%) de los casos. En ocho ocasiones no se especificó el método empleado (tabla 5).

Tabla 5. Métodos empleados en el antibiograma.

Método	Número	%
CMI ^a	17	9,9
Disco-placa	74	43,3
Concentraciones críticas	26	15,2
E-test®	35	20,5
Disco-placa + E-test®	11	6,4
No especificado	8	4,7
Total	171	100,0

^aCMI por microdilución.

En la tabla 6 se informan las marcas empleadas para la realización del antibiograma mediante microdilución y



concentraciones críticas; en total se analizan 43 respuestas. El sistema más utilizado fue el API ATB (60,5%), seguido por Sensititre (25,6%), Wider (4,6%), Microscan (4,6%) y Sceptor (2,3%). Un participante no especificó marca.

Tabla 6. Marcas empleadas en el antibiograma.

Marca	Número	%
Microscan	2	4,6
Wider	2	4,6
Sceptor	1	2,3
Sensititre	11	25,6
API ATB	26	60,5
No especifican	1	2,3
Total	43	100,0

Los resultados de sensibilidad antibiótica, tras la incubación en condiciones de anaerobiosis estricta, suministrados por el centro que actuó como laboratorio de referencia se muestran en la tabla 7. Como siempre, la 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 determinó la CMI mediante E-test® y no realizó técnica de difusión en disco-placa por no considerarlo indicado.

Tabla 7. Sensibilidad antibiótica según el laboratorio de referencia.

Antibiótico	CMI (ml/ml)	Interpretación ^a
Amoxicilina-clavulanato	0,016	S
Clindamicina	0,032	S
Eritromicina	2	R
Metronidazol	1	S
Penicilina	0,064	S
Vancomicina	1	S

^aR: resistente; S: sensible.

Por otra parte, se solicitó a tres profesionales con experiencia una lista de los antibióticos más apropiados a incluir en el estudio de sensibilidad de la cepa objeto de este control (tabla 8). Este Programa considera que la adecuación de la selección de antibióticos que hace cada laboratorio puede considerarse como un criterio añadido de la calidad que ofrece. Como en anteriores controles, los profesionales a los que se les pidió que diesen su opinión partían de los siguientes criterios de selección de los antibióticos: 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 opiniones manifestadas por los profesionales deben ser consideradas como una aproximación o guía general.

Tabla 8. Antibiograma ideal según tres profesionales.

Experto 1	Experto 2	Experto 3 ^a
Penicilina	Penicilina	Penicilina
Clindamicina	Clindamicina	Clindamicina
Metronidazol	Metronidazol	Metronidazol
Cefoxitina		
Amoxicilina-clavulanato	Amoxicilinaclavulanato Moxifloxacino Imipenem	
	,	Ampicilina / Amoxicilina

^aEste experto recomienda un cribado previo de detección de ß-lactamasa

Las respuestas de los laboratorios variaron desde aquéllos que refieren un sólo antibiótico en sus pruebas de sensibilidad, a otros que estudian nueve diferentes, o a otros que estudian varios antibióticos, pero luego sólo informan al clínico una selección de éstos. El número de antibióticos informados se ajusta bastante a las necesidades terapéuticas y al "patrón ideal" que se desprende de la opinión de dos o más de los expertos (penicilina, clindamicina, metronidazol y amoxicilina-clavulanato). Otros antibióticos informados por los participantes fueron: cefoxitina, imipenem y ampicilina / amoxicilina, cefotaxima, cloranfenicol, piperacilina, piperacilina-tazobactam, tetraciclinas y vancomicina.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS

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 18, y están limitados a aquellos participantes cuya identificación fue la aceptada como válida por el Programa de Control de Calidad. En total, se han recibido resultados correspondientes a 13 antibióticos diferentes.



Tabla 9. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos.

Antibiótico	Número	Interpretación ^a		
Aitibiotico	Numero	Sensible	Intermedio	Resistente
Amoxicilina-clavulanato	101	101 (100,0)	_	_
Ampicilina/amoxicilina	30	29 (96,7)	_	1 (3,3)
Clindamicina	159	157 (98,7)	1 (0,6)	1 (0,6)
Cefotaxima	20	20 (100,0)	_	_
Cefoxitina	112	112 (100,0)	_	_
Cloranfenicol	52	50 (96,1)	2 (3,8)	_
Imipenem	115	114 (99,1)	_	1 (0,9)
Metronidazol	133	124 (93,2)	_	9 (6,8)
Penicilina	153	152 (99,3)	_	1 (0,6)
Piperacilina-tazobactam	32	32 (100,0)	_	_
Piperacilina	37	37 (100,0)	_	_
Tetraciclinas	18	18 (100,0)	_	_
Vancomicina	18	18 (100,0)	_	_

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

Analizados los resultados de los participantes desde un punto de vista general, hay una notable coincidencia con los resultados aportados por el laboratorio de referencia para este control. Cabe destacar la uniformidad de resultados y de interpretación de las sensibilidades de los diferentes antibióticos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE SENSIBILIDAD CUANTITATIVA

Se relacionan aquí los resultados correspondientes a aquellos antibióticos informados por un número de laboratorios superior a 20, y que se corresponden con los más significativos desde el punto de vista terapéutico. Son pocos los centros que realizaron este tipo de pruebas en comparación con anteriores controles, debido probablemente, al carácter anaeróbico de *C. perfringens*. Para simplificar las tablas, algunos valores de CMI se han agrupado.

Amoxicilina-clavulanato

Este antibiótico es probado por 27 participantes y, en el 100,0% de los casos, la cepa es considerada como "Sensible". El valor modal de los participantes fue ≤0,016 µg/ml, similar al del laboratorio de referencia (tabla 10).

Tabla 10. Sensibilidad a la amoxicilina-clavulanato^a.

CMI ^a (µg/ml)	Número	%	Sensible
≤0,016	8	29,6	8
≤0,03	7	26,0	7
≤0,25	5	18,5	5
0,47	1	3,7	1
≤4	6	22,2	6
Total	27	100,0	27

Expresada como la concentración del primer componente.

Clindamicina

El laboratorio de referencia obtuvo una CMI 0,032 μ g/ml, por lo que informó como "Sensible", al igual que todos los participantes, cuyos valores modales fueron \leq 2 μ g/ml y 0,094 μ g/ml. Los resultados se resumen en la tabla 11 (se han agrupado datos).

Tabla 11. Sensibilidad cuantitativa a la clindamicina.

CMI (µg/ml)	Número	%	Sensible
≤0,25	30	60,0	30
0,47	1	2,0	1
≤0,5	7	14,0	7
0,75	1	2,0	1
0,94	1	2,0	1
≤1	1	2,0	1
≤2	9	18,0	9
Total	50	100,0	50



Cefoxitina

La cepa fue informada como "Sensible" por el 100,0% de los participantes, siendo el valor modal de éstos ≤0,5 µg/ml. No se comparan los resultados con los del laboratorio de referencia, ya que éste no probó la cefoxitina. Los resultados se resumen en la tabla 12.

Tabla 12. Sensibilidad cuantitativa a la cefoxitina.

CMI (µg/ml)	Número	%	Sensible
≤0,16	4	11,8	4
0,25	3	8,8	3
0,38	3	8,8	3
≤0,5	9	26,5	9
0,75	2	5,9	2
1	3	8,8	3
≤2	2	5,9	2
≤8	1	2,9	1
≤16	7	20,6	7
Total	34	100,0	34

Imipenem

El laboratorio de referencia tampoco informó la sensibilidad a este antibiótico y, al igual que sucede con los antibióticos mencionados hasta ahora, el 100,0% de los participantes interpretaron el valor obtenido como "Sensible", siendo el valor modal ≤0,094 µg/ml. Los datos se resumen en la tabla 13.

Tabla 13. Sensibilidad cuantitativa al imipenem.

CMI (µg/ml)	Número	%	Sensible
≤0,06	4	11,8	4
≤0,094	9	26,5	9
≤0,12	4	11,8	4
0,125	5	14,7	5
0,19	2	5,9	2
0,25	1	2,9	1
0,47	1	2,9	1
≤4	8	23,5	8
Total	34	100,0	34

Metronidazol

La CMI de referencia fue de 1 μ g/ml ("Sensible") y el valor modal de los participantes fue \leq 2 μ g/ml. En el 97,8% de las ocasiones las CMI obtenidas se correspondían con la interpretación de "Sensible". En una ocasión se obtiene un resultado de 32 μ g/ml que se interpreta, de manera adecuada según los criterios NCCLS para *Clostridium*, como "Resistente" (tabla 14).

Tabla 14. Resultados de sensibilidad al metronidazol.

CMI (µg/ml)	Número	%	Sensible	Resistente
≤0,25	2	4,4	2	_
0,38	5	11,1	5	_
0,5	7	15,6	7	_
0,75	6	13,3	6	_
1	4	8,9	4	_
≤2	10	22,2	10	_
≤4	5	11,1	5	_
≤8	5	11,1	5	_
32	1	2,2	_	1
Total	45	100,0	44	1

Penicilina

El laboratorio de referencia informó una CMI de 0,064 μg/mI y el valor modal de CMI de los participantes fue ≤0,064 μg/mI; ambos se corresponden con la categoría de "Sensible". No se obtuvo ninguna interpretación diferente a esta última (tabla 15).



Tabla 15. Pruebas de sensibilidad a la penicilina.

CMI (µg/ml)	Número	%	Sensible
≤0,032	11	20,4	11
≤0,064	20	37,0	20
0,07	1	1,8	1
0,094	3	5,6	3
0,125	2	3,7	2
0,19	1	1,8	1
≤0,25	2	3,7	2
0,32	1	1,8	1
≤0,5	10	18,5	10
1	1	1,8	1
Total	54	100,0	54

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

En el presente control se analizaron 68 hojas de respuesta de participantes que efectuaban algún comentario, a veces varios, por lo que el número total fue de 124. Algunos fueron muy extensos, lo que obligó a sintetizarlos por parte del Programa de Control de Calidad SEIMC, siempre tratando de no desvirtuar la idea que pretendían transmitir. En la tabla 16 se resumen los comentarios técnico-microbiológicos y en la tabla 17 los clínico-terapéuticos.

Tabla 16. Comentarios técnico-microbiológicos efectuados por los participantes.

Comentario	Número	% ^a
No realizamos antibiograma de anaerobios	16	23,5
No disponemos de CMI para anaerobios	2	2,9
No procede la realización del antibiograma	3	4,4
El disco-placa ofrece sólo valores orientativos	3	4,4
El disco-placa no es una técnica correcta según los NCCLS	2	2,9
El método de referencia del antibiograma es la difusión en agar	1	1,5
Realizamos un antibiograma semiautomatizado	1	1,5
No está demostrada la producción de ß-lactamasa en C. perfringens	1	1,5
Detección de ß-lactamasa mediante nitrocefin es negativa	1	1,5
Se trata de una bacteria anaerobia estricta	4	5,9
La bacteria no crece en condiciones de aerobiosis	4	5,9
No hemos podido recuperar la bacteria del liófilo	2	2,9
El cultivo aerobio está contaminado	2	2,9
No crecen bacterias ni las observamos en la tinción de Gram del liófilo	1	1,5
No obtenemos crecimiento en condiciones de anaerobiosis	1	1,5
Se observan bacilos grampositivos (BGP) en la tinción de Gram	3	4,4
BGP con ausencia de esporas	1	1,5
BGP con esporas ovales subterminales	1	1,5
BGP esporulado	1	1,5
Prueba CAMP inverso positiva	7	10,3
Placa de lecitinasa-lactosa positiva	2	2,9
Prueba de la catalasa negativa	1	1,5
Productora de ß-hem ólisis	1	1,5
Movilidad negativa	1	1,5
Enviamos a laboratorio de referencia para identificar y sensibilidad	3	4,4
No realizamos cultivo de anaerobios estrictos	1	1,5
No realizamos identificación de especie	1	1,5
Mediante Microscan identificamos Prevotella melaninogenica	1	1,5
Sugiero un diseño más sencillo de la página web de contestaciones	1	1,5
Total comentarios técnico-microbiológicos	69	101,5

^aSobre las 68 respuestas con comentarios.

Como era de esperar, la mayor parte de los comentarios microbiológicos van dirigidos a la realización del estudio de sensibilidad y a la identificación de esta bacteria anaerobia. Así, el 23,5% de los que hacen comentarios afirma que no realiza dicho estudio en su laboratorio, por lo que alguno de ellos lo remitiría a su centro de referencia. Otros comentan que realizan el antibiograma mediante disco-placa a pesar de ser una técnica poco adecuada, pero no disponen de CMI para anaerobios. Frente a la recomendación de realizar la detección de ß-lactamasa, un participante comenta que no está demostrada su producción en *C. perfringens*. En cuanto a la identificación de *C. perfringens*, el 10,3% obtiene un resultado positivo en la prueba de CAMP inverso, otros observan bacilos grampositivos en la tinción de gram de la colonia, alguno de ellos incluso comenta ver esporas subterminales. Son bastantes los laboratorios que dicen haber tenido problemas con el procesamiento de la muestra, desde el Control de Calidad interpretamos que se



debe a que, en la mayoría de las ocasiones, no sospecharon que se trataba de una bacteria anaerobia, por lo que no la cultivaron en los medios y las condiciones adecuadas. Por último, un participante comenta que le parece complicado el diseño de la hoja de contestaciones de la página web. (Desde el Control de Calidad se trabaja intentado que esta tarea sea lo más sencilla posible, sin que esto suponga una pérdida de información respecto a las contestaciones que se reciben por correo; de cualquier modo estamos dispuestos a recibir cualquier propuesta que sirva para mejorar).

Los comentarios clínico-terapéuticos, como en otras ocasiones, se agrupan en dos categorías: los que hacen referencia al tratamiento y los relacionados con las características de la infección. La mayoría de los participantes que comentan la pauta terapéutica recomiendan como tratamiento de elección la penicilina a altas dosis (13,2%) o la penicilina asociada o no a la clindamicina (20,6%). Como tratamientos alternativos o complementarios sugieren la clindamicina, el cloranfenicol, el metronidazol, las tetraciclinas y el imipenem. Además del tratamiento antibiótico, se comentan el desbridamiento quirúrgico de la lesión (11,8%) y la oxigenoterapia hiperbárica (4,4%). El 2,9% recomienda tomar medidas de aislamiento cutáneo y un participante aconseja la administración de la vacuna y la gammaglobulina antitetánica. El 10,3% comenta que el cuadro que presenta el paciente es de gangrena gaseosa y mionecrosis. El resto de los comentarios se expresan en la tabla 18.

Tabla 17. Comentarios clínicos y terapéuticos realizados por los participantes.

Comentario	Número	% ^a
El tratamiento de elección es penicilina +/- clindamicina	14	20,6
El tratamiento de elección es penicilina a altas dosis	9	13,2
El tratamiento empírico del paciente es el adecuado	2	2,9
Alternativas: cloranfenicol, clindamicina, metronidazol, tetraciclina imipenem	2	2,9
El tratamiento alternativo es clindamicina	1	1,5
El tratamiento alternativo es imipenem	1	1,5
Asociar clindamicina al tratamiento para disminuir la producción de toxinas	1	1,5
Algunas cepas son resistentes a clindamicina	1	1,5
Lo más importante es el desbridamiento quirúrgico	8	11,8
Se puede utilizar la oxigenoterapia hiperbárica	3	4,4
Vacunar del tétanos al paciente y administrarle la gammaglobulina	1	1,5
Tomar medidas de aislamiento cutáneo	2	2,9
Produce un cuadro de gangrena gaseosa y mionecrosis	7	10,3
Por la historia clínica sospechamos que se trata de un anaerobio	1	1,5
Posible infección por Clostridium septicum	1	1,5
Se observan algunos signos de sepsis	1	1,5
Total comentarios clínico-terapéuticos	55	80,9

^aSobre las 68 respuestas con comentarios.

UTILIZACIÓN DE LABORATORIO EXTERNO

Por lo que respecta a la necesidad de utilizar un laboratorio externo para la identificación de la cepa o para el estudio de sensibilidad, se obtienen los siguiente datos: 221 (89,1%) laboratorios dicen no utilizarlo, 21 (8,5%) no lo informan y 6 (2,4%) afirman haberlo utilizarlo, 3 (1,2%) de ellos parcialmente.