

Validación de antibiogramas de bacilos gram negativos reportados de MicroScan

- Dr. Juan Jacobo Ayala Gaytán¹
- Dr. Carlos Díaz Olachea²
- Q.C.B. Claudia Elena Guajardo Lara³
- Q.C.B. Margarita del Roble Navarro Mata⁴
- Q.C.B. Patricia Riojas Montalvo⁵

Resumen

- **Palabras clave:** pruebas de susceptibilidad, antibiogramas, *E. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*.

• Objetivo

Evaluar la eficacia del sistema automatizado MicroScan Walkaway 96 (Dade Behring) en su reporte de susceptibilidad antimicrobiana para bacilos Gram negativos aislados cotidianamente comparando los resultados con los de un sistema de referencia de microdilución en caldo.

• Material y métodos

Los bacilos gram negativos más frecuentemente aislados en el laboratorio de microbiología de pacientes hospitalizados y obtenidos de sangre, cavidades cerradas estériles y sitios de importancia clínica, fueron identificados y probada su susceptibilidad antimicrobiana con el sistema Walkaway 96 (MicroScan Dade Behring) durante los años 2006 y 2007. Posteriormente, en cada año del estudio se compararon estos resultados automatizados con aquéllos obtenidos con un sistema de referencia de microdilución en caldo.

• Resultados

Se demuestra que el sistema automatizado no detecta adecuadamente resistencia en aislamientos clínicos

cotidianos, sobre todo en Cefotaxima, Piperacilina/Tazobactam, y Ciprofloxacina, y que el tipo de discordancias fue mínima cuando se probaron para imipenem o meropenem.

• Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con otros similares reportados en la literatura, es necesario que se continúe apeándose a las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para el buen funcionamiento de estos sistemas.

Introducción

De las actividades que efectúa el laboratorio de microbiología clínica, el determinar la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es la que tiene mayor impacto en el manejo del paciente, además de que estos estudios son fundamentales para conocer la tendencia de resistencia en los microorganismos de importancia clínica, para así establecer políticas de utilización de antimicrobianos.

Por ello, la mayoría de los cambios ocurridos en las últimas décadas en la microbiología clínica se relacionan con los estudios *in vitro* de susceptibilidad y debido a la preferencia de las técnicas de microdilución en caldo para llevarlos a cabo, se da lugar al desarrollo de sistemas automatizados. Uno de ellos es el MicroScan (Dade Behring) que usa placas comerciales y aunque pueden leerse visualmente, cuenta con un lector automático; el Walkaway usa substratos fluorogénicos para obtener rápidamente la identificación y susceptibilidad de la bacteria, también ofrece un sistema para manejo de información. En estos estudios, el reporte de "resistencia" a algún

¹ Unidad de Vigilancia Epidemiológica del Hospital San José Tec de Monterrey.
^{2,3,4,5} Departamento de Microbiología del Laboratorio del Hospital San José Tec de Monterrey.

antimicrobiano predice mejor el fracaso terapéutico, que su contraparte “susceptible” predice el éxito; por lo que un falso reporte de susceptibilidad tiene peores consecuencias para el enfermo que uno de falsa resistencia.¹ Además, determinan el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antimicrobiano en el resultado de la prueba de susceptibilidad, debido a: 1) hay buena correlación entre fracaso y valor de CMI; 2) estudios farmacodinámicos demuestran su importancia terapéutica, lo que ayuda a una dosificación más eficaz; y 3) la evolución de los valores de CMI en una determinada especie bacteriana es de interés epidemiológico.^{2,3}

A pesar de los avances, los sistemas automatizados no están exentos de errores, lo que puede tener serias implicaciones en la evolución del paciente; los errores más frecuentemente reportados involucran *Pseudomonas aeruginosa* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.^{4,5} Por ello, para que los estudios de susceptibilidad *in vitro* sean confiables, es necesaria la estandarización de los métodos empleados y seguir las normas establecidas, por lo general, del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).^{6,7} Los programas de evaluación sugieren incluir cepas de referencia, microorganismos con mecanismos de resistencia conocidos y cepas clínicas aisladas cotidianamente; además, se sugiere que es conveniente desarrollar programas de control encaminados a determinar la fiabilidad de los resultados obtenidos con estos sistemas, comparándolos con los obtenidos por otro método de referencia.

En este estudio se evalúa la eficacia del sistema automatizado MicroScan Walkaway 96 (Dade Behring) en su reporte de susceptibilidad antimicrobiana para bacilos Gram negativos aislados cotidianamente y se comparan los resultados con los obtenidos con un sistema de referencia de microdilución en caldo.

Material y métodos

Diseño del estudio

Los bacilos Gram negativos más frecuentemente aislados en el laboratorio de microbiología de pacientes hospitalizados y obtenidos de sangre, cavidades cerradas estériles y sitios de importancia clínica, fueron identificados y probada su susceptibilidad antimicrobiana con el sistema Walkaway 96 (MicroScan Dade Behring) durante los años 2006 y 2007. Posteriormente, en cada año del estudio se compararon estos resultados automatizados con aquéllos obtenidos con un sistema de referencia de microdilución en caldo.

Métodos de susceptibilidad

Las pruebas de susceptibilidad por MicroScan se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se usaron los combos NUC35 (para los aislamientos en orina) y NBPC 30 (para los aislamientos de otras muestras), los paneles se inocularon usando el sistema PROMPT (Dade Behring Ins. West Sacramento CA, USA). Las pruebas de microdilución en caldo se efectuaron de acuerdo a las normas del CLSI,^{6,7} las placas de microdilución se prepararon en el laboratorio con las sales de los antimicrobianos a las mismas concentraciones que el MicroScan; se usaron sólo las combinaciones antibiótico-organismo sugeridas. El control de calidad se llevó a cabo en cada prueba de microdilución en caldo con las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922, mismas cepas que se usaron como control de calidad en MicroScan antes de que un nuevo lote de paneles se usara.

Criterios de evaluación

Los resultados obtenidos por el MicroScan se consideraron discordantes con los obtenidos por microdilución (método de referencia) cuando existían ≥ 2 diluciones de diferencia. Para los resultados discordantes observados al comparar las categorías clínicas obtenidas con ambos métodos establecidos según los puntos de corte del CLSI, se definieron los siguientes tipos de error:

- Máximo, muy mayor o falsa susceptibilidad (susceptible por MicroScan y resistente por microdilución).
- Error mayor o falsa resistencia (resistente por MicroScan y susceptible por microdilución).
- Error menor (intermedio por un método y susceptible o resistente por el otro).

Resultados

Se estudiaron 60 aislamientos de *Escherichia coli*, 20 de *Salmonella spp*, 15 de *Klebsiella pneumoniae*, y 30 de *Pseudomonas aeruginosa*. Se usaron los siguientes antimicrobianos: meropenem (Mer), ceftazidima (Caz), ciprofloxacina (Cp), gentamicina (Gm), imipenem (Imp), piperacilina/tazobactam (P/T), tobramicina (To), amikacina (Ak), aztreonam (Azt), cefotaxima (Cft), cefepime (Cpe), cefoxitin (Cfx).

Se detectaron 106 discordancias en los aislamientos de *Escherichia coli*, predominando en P/T, Caz, To, Cp (ver Figura 1), los errores muy mayores predominaron en CAZ,Cp,To, (ver Tabla 1), los mayores en To, Gm y Cpe. En el caso de *Salmonella spp* ocurrieron 32 discordancias en un número mayor de antibióticos

(ver Figura 2), aunque los errores muy mayores sólo se apreciaron en 3 antibióticos: Caz, Azt, Cp (ver Tabla 2), Ak predominó por la cantidad de errores mayores. Las discordancias (36) fueron mucho más altas en el caso de las 15 cepas de *Klebsiella pneumoniae* (ver Figura 3), destacó la Cp tanto en errores muy mayores y mayores, y los aminoglucósidos Gm y To en los mayores (ver Tabla 3). Ningún antibiótico estuvo exento de discordancias en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, destacó de nuevo Caz y apareció por vez primera Mer (ver Figura 4); sin embargo, los errores muy mayores sólo se observaron en Caz, Gm y To, destacó Ak por no existir errores muy mayores o mayores (ver Tabla 4).

Discusión

Los sistemas automatizados representan un avance importante en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de la mayoría de las bacterias aisladas cotidianamente en muestras clínicas. Su uso se ha generalizado debido a que procesan mayores volúmenes de muestras, disminuye el tiempo de reporte, demuestra costo-beneficio y tiene interfaces que les permiten conectarse con los sistemas de información del hospital. Sin embargo, su empleo conlleva una serie de inconvenientes de los que, quizás, el de mayor importancia sea el obtener datos falsos de susceptibilidad, como se ha descrito con los antibióticos - lactámicos, quinolonas, entre otros, en diversas especies de bacterias,⁸ los que pueden tener serias implicaciones en la evolución del paciente.⁹

Los errores muy mayores y mayores encontrados durante las pruebas de validación pudieran ser debido a degradación del antimicrobiano en los paneles que se usan en el hospital, como ya es conocido para Imp;¹⁰ problemas con los instrumentos automatizados que interpretan la susceptibilidad, condiciones inadecuadas en el almacenamiento de las placas, o bien errores técnicos como la sobreinoculación, tiempos de incubación, entre otros, como lo demuestra Steward et al¹¹ quien encuentra más de un 70% de estos errores en el reporte de la susceptibilidad cuando se enviaron diversas muestras de *Enterobacteriaceae* a laboratorios que contaban con sistemas automatizados y más de un 25% en el caso de *P. aeruginosa*.

Los resultados demuestran que el sistema no detecta adecuadamente resistencia en aislamientos clínicos cotidianos sobre todo en Caz, P/T, y Cp con rangos de error de aproximadamente 20%; Sader, et al¹² reportan errores de este tipo hasta en el 27% de las

veces cuando se estudia piperacilina-tazobactam en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, quizá debido a lo estrecho del punto de corte de resistencia ($MIC \geq 128 \mu\text{g/ml}$) y los resultados mostraban una dilución mayor.

Los errores muy mayores y mayores por lo general se reportan sobre todo en Caz, P/T, y mucho menos en Ak.^{13,14} Resultados semejantes fueron los que se encontraron en este estudio, destaca, sin embargo, que el número de errores es mínimo en el caso de los carbapenems, sobre todo meropenem.

Desde 1980¹⁵ se usan las categorías: muy mayor, mayor o menor para describir los errores encontrados cuando se evalúa la efectividad de un nuevo sistema automatizado que se compara con los resultados obtenidos generalmente por los métodos de microdilución en caldo y difusión en disco; ello como requisito previo para salir al mercado, pero, posteriormente ya no se repiten. Cuando estos estudios se efectúan en laboratorios de microbiología clínica que utilizan cotidianamente sistemas automatizados, se está muy lejos de alcanzar la regla de oro de Thornsberry y Gavan:¹⁶ "las concordancias entre métodos debe ser mayor del 90% y el total de los errores mayor y muy mayor debe ser menor del 5%". Sin embargo, no se debe sacrificar la efectividad por rapidez; por lo que es necesario apegarse a todas y cada una de las recomendaciones que efectúa el CLSI, y así tratar de disminuir el número de discordancias, y enfatizar en aquéllas que mayor repercusión podrían tener en el paciente.

Conclusiones

La discordancia entre los resultados de susceptibilidad antimicrobiana efectuados mediante el sistema automatizado MicroScan al compararlos con los resultados del método de referencia de microdilución en caldo en los principales aislamientos cotidianos de bacilos Gram negativos en el laboratorio de microbiología del hospital, es mayor que la usualmente referida cuando un nuevo sistema va a salir al mercado, pero semejante cuando se efectúa en laboratorios de microbiología que cuentan con estos mismos sistemas en uso cotidiano.

Las principales discordancias ocurren con los antibióticos Caz, P/T. Aunque los resultados de este estudio concuerdan con los de estudios similares reportados en la literatura, es necesario que se continúe apegándose a las recomendaciones del CLSI para el buen funcionamiento de estos sistemas.

Figura 1. Porcentaje de discordancias por antibiótico

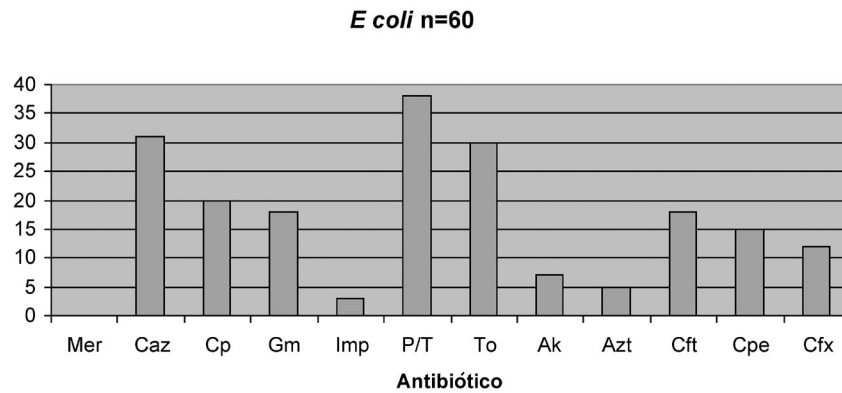
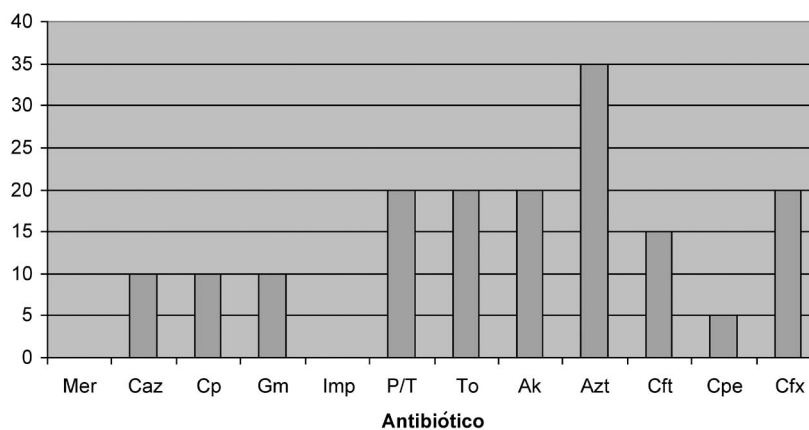


Tabla 1. Distribución de discordancias por tipo de error E coli n=60

Antibiótico	Muy mayor	%	Mayor	%	Menor	%
Meropenem	0	0	0	0	0	0
Ceftazidima	11	18.83	1	1.66	7	11.66
Ciprofloxacina	8	13.33	4	6.66	0	0
Gentamicina	0	0	9	15	2	3.33
Imipenem	0	0	2	3.33	0	0
P/T	1	1.66	4	6.66	5	8.3
Tobramicina	4	6.66	13	21.6	1	1.66
Amikacina	0	0	4	6.66	0	0
Aztreonam	0	0	3	5	0	0
Cefotaxima	3	5	7	11.11	1	1.66
Cefepime	1	1.66	8	13.3	0	0
Cefoxitin	3	5	3	5	1	1.66

Figura 2. Porcentaje de discordancias por antibiótico**Salmonella spp n=20****Tabla 2.** Distribución de discordancias por tipo de error Salmonella spp n=20

Antibiótico	Muy mayor	%	Mayor	%	Menor	%
Meropenem	0	0	0	0	1	5
Ceftazidima	6	30	0	0	1	5
Ciprofloxacina	2	10	0	0	0	0
Gentamicina	0	0	1	5	1	5
Imipenem	0	0	0	0	0	0
P/T	0	0	1	5	1	5
Tazobactam	0	0	1	5	1	5
Amikacina	0	0	2	10	0	0
Aztreonam	5	25	0	0	2	10
Cefotaxina	0	0	0	0	3	15
Cefepime	0	0	0	0	1	5
Cefoxitin	1	5	0	0	3	15

Figura 3. Porcentaje de discordancias por antibiótico

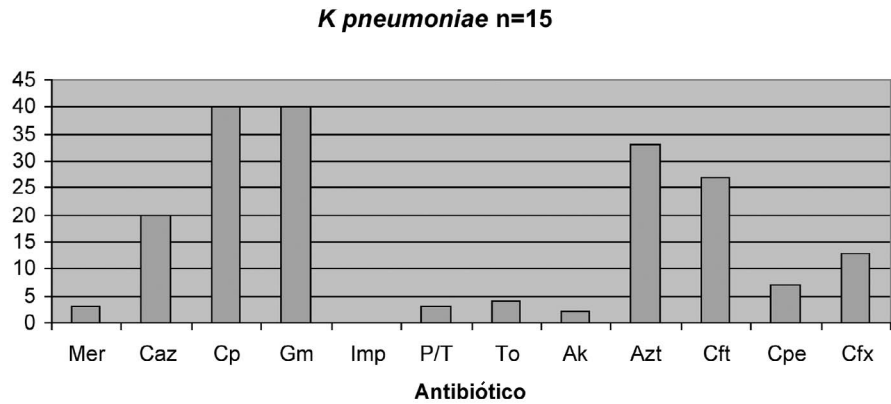
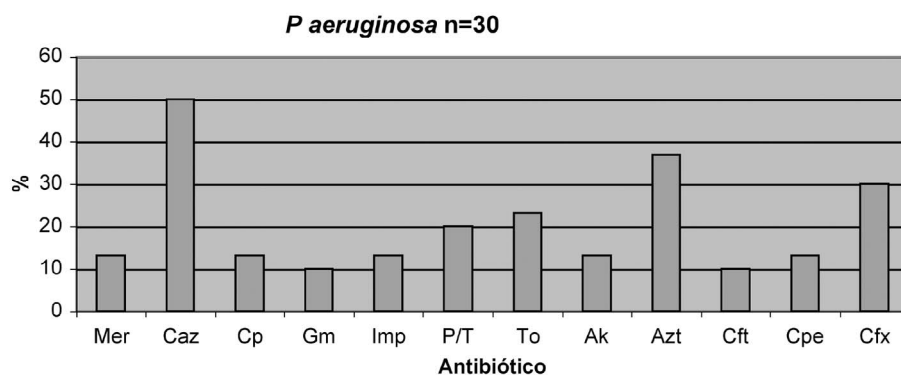


Tabla 3. Distribución de discordancias por tipo de error *Klebsiella pneumoniae* n=15

Antibiótico	Muy mayor	%	Mayor	%	Menor	%
Meropenem	0	0	0	0	0	0
Ceftazidima	1	6.7	2	13	0	0
Ciprofloxacina	3	20	2	13	1	6.7
Gentamicina	0	0	3	20	3	20
Imipenem	0	0	0	0	0	0
P/T	1	6.7	1	6.7	1	6.7
Tobramicina	0	0	2	13	2	13
Amikacina	0	0	1	6.7	1	6.7
Aztreonam	0	0	0	0	5	33.3
Cefotaxima	2	13	1	6.7	1	6.7
Cefepime	0	0	1	6.7	0	0
Cefotaxima	0	0	0	0	2	13

Figura 4. Porcentaje de discordancias por antibiótico**Tabla 4.** Distribución de discordancias por tipo de error *P aeruginosa* n=30

Antibiótico	Muy mayor	%	Mayor	%	Menor	%
Meropenem	0	0	4	13	0	0
Ceftazidima	7	23	0	0	8	26
Ciprofloxacina	0	0	1	3	3	10
Gentamicina	2	7	1	3	0	0
Imipenem	0	0	3	10	1	3
P/T	1	3	3	10	2	7
Tobramicina	2	7	3	10	2	7
Amikacina	0	0	0	0	4	13
Aztreonam	0	0	2	7	9	30
Cefotaxima	0	0	2	7	1	3
Cefepime	0	0	2	7	2	7
Cefoxitin	0	0	9	30	0	0

Referencias bibliográficas:

1. Martínez-Martínez L. El futuro de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21(Supl 2): 64-71.
2. Pelonquin CA, Cumbo TJ, Nix DE, Sands MF, Schentag JJ. Evaluation of intravenous ciprofloxacin in patients with nosocomial lower respiratory tract infections. *Arch Intern Med* 1989; 149: 2269-73.
3. Soriano F. Aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos para la lectura interpretada del antibiograma. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20: 407-12.
4. Fernández F, Martínez L, Pascual A, Perea EJ. Falsa resistencia a imipenem en bacilos gram negativos mediante un sistema automatizado. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18: 500-05.
5. Steward CD, Stocker SA, Swenson JA, O'Hara CM, Edwards JR, Gaynes RP, McGowan JE, Tenover FC. Comparison of agar dilution, disk diffusion, MicroScan, and Vitek antimicrobial susceptibility testing methods to broth microdilution for detection of fluoroquinolone-resistant isolates of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*, 1999; 37:544-47.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Seven Edition*. CLSI document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2006.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement*. CLSI document M 100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2006.
8. Ferraro MJ, Jorgensen JH. Instrument-based antibacterial susceptibility testing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Dirs. *Manual of Clinical Microbiology* (7a ed). Washington DC: American Society for Microbiology, 1999; 1.379-1.384.
9. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichey RM, Fraser VJ, Kollef MH. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:1306-11.
10. Carmeli Y, Eichelberger K, Soja D, Dakos J, Venkataraman L, DeGirolami PC, Samore M. Failure of quality control measures to prevent reporting of false resistance to imipenem, resulting in a pseudo-outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1988, 36:595-7.
11. Steward CD, Mohammed JM, Swenson JM, Stocker SA, Willams PP, Gaynes RP, McGowan JE, Tenover FC. Antimicrobial susceptibility testing of carbapenems: multicenter validity testing and accuracy levels of five antimicrobial test methods for detecting resistance in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Clin Microbiol*, 2003; 41:351-58.
12. Sader HS, Fritsche TR, Jones RN. Accuracy of three automated systems (MicroScan Walk Away, VITEK, and VITEK 2) for susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* against five broad-spectrum beta-lactam agents. *J Clin Microbiol*, 2006; 44: 1101-04.
13. Murray PR, Niles AC, Heeren RL. Comparison of a highly automated 5-h susceptibility testing system, the Cobas-Bact. With two reference methods: Kirby-Bauer disk diffusion and Broth Microdilution. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2372-2377.
14. Kelly MT, Leicester C. Evaluation of the Autoscan Walk-away System for rapid identification and susceptibility testing of gram negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1568-1571.
15. Thornsberry C, Anhalt JP, Washington II JA, McCarthy LR, Schoenknecht FD, Sherris JC, Spencer HJ. Clinical laboratory evaluation of the Abbott MS-2 automated antimicrobial susceptibility testing system: report of a collaborative study. *J Clin Microbiol* 1980; 12: 375-90.
16. Thornsberry C, Gavan TL. Automated procedures for antimicrobial susceptibility tests, P. 491-494. In E.H. Lennette, A.L. Balows, W.J. Hausler Jr, and J.P. Tenover (ed), *Manual of clinical microbiology*, 3ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Correspondencia:
 Dr. Juan Jacobo Ayala Gaytán
 Email: jjag@hsj.com.mx