

## ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL (MB-3/15)

En el Análisis de Resultados del presente control se analizan los resultados obtenidos en el estudio micobacteriológico de la muestra enviada para control externo. Se trató de un tubo de Löwenstein-Jensen sembrado por el Programa de Control de Calidad Externo SEIMC (Programa CCS) con la micobacteria a estudio. Ésta se había obtenido a partir de una cepa de reserva que había sido debidamente almacenada y, cuyo estudio, fue realizado por los laboratorios expertos (externos) que actuaron de referencia para el Programa CCS. Además, se confirmó la homogeneidad y estabilidad de la muestra a través de ensayos realizados tras la siembra de los tubos de Löwenstein-Jensen y tras su envío, asegurando así la validez de la misma.

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

El presente 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 este control, se envió a los distintos laboratorios participantes una cepa de micobacteria en medio de Löwenstein-Jensen. La micobacteria había sido aislada de un paciente varón de 57 años de edad, albañil de profesión, que acudía a su médico de familia por presentar un par de lesiones abscesificadas en el dorso de la mano derecha de 10 días de evolución. El paciente relataba que hacía un par de semanas se había hecho una herida superficial en esa mano con un utensilio del trabajo y que se la habían “desinfectado” con suero fisiológico del botiquín. A pesar de que en casa mantuvo una asepsia adecuada, la lesión no mejoraba, evolucionando hasta la ulceración y la formación de dos pequeños nódulos subcutáneos eritemato-violáceos, dolorosos y fluctuantes con edema local, exudado sero-sanguinolento y adenopatías regionales. A la exploración física, no se encontraron hallazgos de interés, salvo la lesión descrita. Se tomó una muestra del exudado de la herida que fue remitido al Servicio de Microbiología para estudio bacteriológico, micológico y de micobacterias. A los cinco días de incubación creció en medio líquido la micobacteria que fue el objeto del presente control de calidad.

Se solicitó a los centros participantes la **identificación** de la micobacteria implicada en el caso clínico y la realización de **pruebas de sensibilidad**, así como los **comentarios y sugerencias** que considerasen oportunos.

## VALOR ASIGNADO

El valor asignado (valor de referencia) para la identificación de la micobacteria remitida a los centros participantes fue *Mycobacterium abscessus*. Esta identificación de referencia se obtuvo mediante hibridación inversa (GenoType *Mycobacterium* CM, Hain) y fue confirmada por secuenciación del ARN ribosómico 16S.

Los resultados de sensibilidad antibiótica del consenso de expertos (valor asignado) fueron obtenidos por microdilución en caldo con el sistema comercial Sensititre™ y se muestran en la tabla 1. El consenso de expertos usó para la interpretación de los resultados los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) correspondientes a las micobacterias de crecimiento rápido.

**Tabla 1. Estudio de sensibilidad de consenso de expertos.**

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Categorización <sup>a</sup>
Linezolid	8	S
Amikacina	2	S
Claritromicina	1	S
Cotrimoxazol	>8	R
Doxiciclina	>16	R
Cefoxitina	128	R
Imipenem	32	R
Ciprofloxacino	4	R
Moxifloxacino	4	R
Minociclina	>8	R

<sup>a</sup>S: sensible, R: resistente.

## PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 106 centros inscritos a este control, de los que respondieron 94. Un centro no realizó la identificación ni el antibiograma comentando que en esos momentos no disponía de medios para identificar la micobacteria, por lo que hubo 93 respuestas con resultados valorables, lo que supone un porcentaje de participación del 87,7%. Este porcentaje es similar al del último control de Micobacteriología, en el que se envió una cepa de *Mycobacterium marinum* (89,6% de participación) y al del control MB-2/12, en el que también se remitió un *M. abscessus* (participación del 87,0%).

## IDENTIFICACIÓN

El Programa de Control de Calidad aceptó como óptima la identificación de especie *M. abscessus*, y como aceptables las de *Mycobacterium chelonae/abscessus* y *Mycobacterium abscessus/immunogenum*, dada la elevada similitud genética que presenta *M. abscessus* con *M. chelonae* y con *M. immunogenum*. De hecho, algunos sistemas comerciales no diferencian entre estas especies.

Como puede observarse en la tabla 2, la mayoría de los laboratorios (73,1%) identificaron correctamente la especie. Once laboratorios (11,8%) informaron *M. abscessus/immunogenum* y otros cuatro (4,3%) *M. chelonae/abscessus*, con lo que el porcentaje de acierto total fue del 89,2%.

**Tabla 2. Resultados de la identificación micobacteriana.**

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium abscessus</i>	68	73,1
<i>Mycobacterium abscessus/immunogenum</i>	11	11,8
<i>Mycobacterium chelonae/abscessus</i>	4	4,3
<i>Mycobacterium chelonae</i>	3	3,2
<i>Mycobacterium</i> (no <i>M. tuberculosis</i> )	2	2,1
Complejo <i>Mycobacterium fortuitum/chelonae</i>	1	1,1
Género <i>Mycobacterium</i>	1	1,1
Micobacteria de crecimiento rápido	1	1,1
<i>Mycobacterium chelonae</i> complex	1	1,1
<i>Mycobacterium chelonae</i> sp. <i>mucogenicum</i>	1	1,1
Total	93	100,0

## MÉTODOS Y MARCAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN

En cuanto a los métodos utilizados para la identificación, de los 93 centros que enviaron la hoja de respuesta con datos analizables, 5 (5,3%) no aportaron información al respecto, recurriendo cuatro de ellos a un laboratorio externo de referencia.

Las técnicas empleadas mayoritariamente por los participantes fueron los métodos moleculares, destacando, en primer lugar, las pruebas de hibridación inversa, que se usaron, bien en solitario o bien combinadas con otro método (PCR a tiempo real, espectrometría de masas, sondas moleculares, inmunocromatografía, PCR-RFLP, pruebas bioquímicas, o características morfo-culturales) por 58 participantes (62,4%). En segundo lugar destaca la espectrometría de masas, que fue empleada por 21 laboratorios (22,6%). Respecto a las sondas moleculares, fueron usadas por 9 centros (9,7%), en todos los casos junto a otros métodos moleculares o pruebas bioquímicas. En este control, las pruebas bioquímicas clásicas sólo fueron informadas por 6 participantes (6,4%), en todos los casos junto a algún método molecular. El conjunto de los métodos empleados queda reflejado en la tabla 3.

**Tabla 3. Métodos utilizados para la identificación.**

<b>Método</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
Hibridación inversa	28	30,1
Espectrometría de masas	13	13,9
Hibridación inversa + PCR a tiempo real	6	6,4
Hibridación inversa + espectrometría de masas	5	5,3
Hibridación inversa + sonda	5	5,3
Hibridación inversa + inmunocromatografía	4	4,3
Hibridación inversa + PCR-RFLP	3	3,2
Oligocromatografía	3	3,2
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa	3	3,2
Espectrometría de masas + secuenciación	2	2,2
Hibridación inversa + características morfo-culturales	2	2,2
Inmunocromatografía	2	2,2
PCR a tiempo real	2	2,2
Secuenciación	2	2,2
Características morfológicas y culturales	1	1,1
Espectrometría de masas + sonda	1	1,1
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa + PCR-RFLP	1	1,1
Pruebas bioquímicas + secuenciación	1	1,1
Pruebas bioquímicas + sonda	1	1,1
Secuenciación + características morfo-culturales	1	1,1
Sonda + hibridación inversa + inmunocromatografía	1	1,1
Sonda + inmunocromatografía	1	1,1
No informa	5	5,3
<b>Total</b>	<b>93</b>	<b>100,0</b>

<sup>a</sup>PCR: reacción en cadena de la polimerasa; RFLP: *restriction fragment length polymorphism*.

En cuanto a las marcas comerciales empleadas, los centros que informaron una técnica de hibridación inversa usaron el equipo comercial GenoType *Mycobacterium* CM de Hain (51,0%), seguido del INNO-LiPA® de Fujirebio (8,4%). Sin embargo, el índice de aciertos para la identificación absoluta de la especie *M. abscessus* con estos dos sistemas comerciales ha sido más bajo que en otros controles (69,4% y 62,5%, respectivamente). Esto puede relacionarse con la cercanía genética existente entre especies como *M. abscessus*, *M. immunogenum* y *Mycobacterium chelonae*. Así, el GenoType® *Mycobacterium* CM no diferencia *M. abscessus* de *M. immunogenum*; mientras que, el INNO-LiPA®, a pesar de los diferentes genotipos incluidos de *M. chelonae*, no discrimina entre estas tres especies.

Hubo 21 centros (21,9%) que usaron el MALDI-TOF (Bruker o VITEK® MS), identificando todos ellos *M. abscessus* con la excepción de uno, que informó *M. abscessus/immunogenum*. Respecto al Speed-Oligo® *Mycobacteria* de Vircell, los 3 centros que la emplearon identificaron correctamente la especie. La totalidad de las

marcas empleadas se muestra en la tabla 4, mientras que la capacidad de los tres sistemas comerciales mayoritarios para identificar la cepa se resume en la tabla 5.

**Tabla 4. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.**

Método comercial	Número	% uso	% acierto
GenoType® <i>Mycobacterium</i> (Hain)	49	51,0	69,4
MALDI-TOF (Bruker / VITEK® MS)	21	21,9	95,3
INNO-LiPA® (Fujirebio)	8	8,4	62,5
Manual <sup>a</sup>	5	5,2	100,0
Speed-Oligo® <i>Mycobacteria</i> (Vircell)	3	3,1	100,0
Becton-Dickinson <sup>b</sup>	2	2,1	0,0
Accuprobe® (Gen-probe, bioMérieux)	1	1,0	0,0
No informa	7	7,3	57,2
Total	96	100,0	74,0

<sup>a</sup>Se incluyen: pruebas bioquímicas, características morfo-culturales, RFLP y secuenciación.

<sup>b</sup>Inmunocromatografía para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

**Tabla 5. Resultados de identificación de *M. abscessus* con los sistemas mayoritarios.**

Sistema	Número usuarios	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> / <i>immunogenum</i>	<i>M. chelonae</i> / <i>abscessus</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. fortuitum</i> / <i>chelonae</i>
GenoType <i>Mycobacterium</i>	49	34 (69,4)	11 (22,5)	1 (2,0)	3 (6,1)	0 (0,0)
MALDI-TOF	21	20 (95,3)	1 (4,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
INNO-LiPA®	8	5 (62,5)	0 (0,0)	2 (25,0)	0 (0,0)	1 (12,5)

## RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

El estudio de sensibilidad fue realizado por 52 (55,9%) de los 93 centros que enviaron la hoja de respuesta con resultado evaluable (tabla 6). La técnica mayoritaria fueron las tiras de gradiente de concentración, utilizadas por 24 centros (46,2%), empleándose como método único por el 36,6%. Le sigue en frecuencia la microdilución en caldo, realizada por 20 centros (38,5%) y empleada como método único por otro 36,6%. Hubo 5 participantes (9,6%) que emplearon el disco-placa, 2 (3,8%) el método de las proporciones, y 1 (1,9%) la dilución en medio líquido. Finalmente, 6 participantes (11,5%) no aportaron datos sobre el método empleado, enviando todos ellos la cepa a su centro de referencia para la realización del estudio de sensibilidad. La totalidad de los métodos empleados se muestra en la tabla 6.

**Tabla 6. Métodos empleados en el antibiograma.**

Método	Número	%
--------	--------	---

Microdilución	19	36,6
Tiras de gradiente de concentración	19	36,6
Disco-placa + tiras de gradiente de concentración	3	5,8
Disco-placa	2	3,8
Proporciones + tiras de gradiente de concentración	2	3,8
Dilución en medio líquido + microdilución	1	1,9
No informa	6	11,5
<b>Total</b>	<b>52</b>	<b>100,0</b>

En cuanto a los equipos comerciales empleados, destacan, en primer lugar, el panel de microdilución de Sensititre™, que fue usado por 18 centros (34,0%). A continuación le siguen las tiras de E-test® de bioMérieux (13 centros, 24,5%), mientras que las tiras de gradiente de concentración de Oxoid fueron informadas por 2 centros (3,8%). Hubo 16 participantes (30,2%) que no aportaron información acerca de la marca comercial, de los cuales nueve utilizaron tiras de gradiente de concentración. El conjunto de las marcas empleadas para el estudio de sensibilidad se muestra en la tabla 7. Hay que señalar que la marca de tiras Liofilchem no estaba creada en este control, por lo que no se dispone de esta información en la tabla (este valor estará disponible en los sucesivos controles).

**Tabla 7. Marcas empleadas en el antibiograma.**

<b>Marca</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
Sensititre™	18	34,0
E-test® (bioMérieux)	13	24,5
Oxoid (tiras gradiente concentración)	2	3,8
Manual <sup>a</sup>	4	7,5
No informa <sup>b</sup>	16	30,2
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>100,0</b>

<sup>a</sup>Incluye disco-placa (3) y microdilución (1).

<sup>b</sup>Incluye tiras de gradiente concentración (9), microdilución (1) y método desconocido (6).

## **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS DE LOS PARTICIPANTES**

En cuanto a los criterios de puntos de corte utilizados para la interpretación del antibiograma, de los 52 laboratorios que realizaron un antibiograma de micobacterias, 39 (75,0%) emplearon los criterios del CLSI, 10 (19,2%) los publicados en la bibliografía, y 2 (3,9%) en base a los criterios del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Por último, hubo 1 laboratorio (3,7%) que recibió el resultado del antibiograma de su centro de referencia desconociendo que criterios había utilizado éste. Todos estos datos se resumen en la tabla 8.

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

Marca	Número	%
CLSI	39	75,0
Bibliografía	10	19,2
Antibiograma en centro de referencia	1	1,9
EUCAST	2	3,9
Total	52	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 10. En total, se han recibido resultados correspondientes a 32 antibióticos diferentes. Como se observa en dicha tabla, existe una buena concordancia entre los laboratorios participantes y el valor asignado para la sensibilidad frente a doxiciclina y amikacina y, aunque algo inferior, también para cotrimoxazol, moxifloxacino y claritromicina. Sin embargo, en el caso del linezolid, un 62,0% de los centros aportaron un resultado resistente, discrepante con el valor asignado, sin asociación con ningún método o marca en concreto.

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

Antibiótico	Número	Categorización <sup>a</sup>		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Amikacina	50	48 (96,0)	0	6 (4,0)
Amoxicilina-clavulanato	13	0	0	13 (100,0)
Cefoxitina	34	3 (8,8)	10 (29,4)	21 (61,8)
Ciprofloxacino	45	3 (6,6)	4 (8,9)	38 (84,5)
Claritromicina	50	40 (80,0)	0	10 (20,0)
Cotrimoxazol	31	3 (9,7)	0	28 (90,3)
Doxiciclina	34	0	0	34 (100,0)
Imipenem	34	3 (8,8)	9 (26,5)	22 (64,7)
Linezolid	42	8 (19,0)	8 (19,0)	26 (62,0)
Minociclina	12	0	0	12 (100,0)
Moxifloxacino	24	0	4 (16,7)	20 (83,3)
Tobramicina	25	14 (56,0)	3 (12,0)	8 (32,0)

<sup>a</sup>Los números entre paréntesis indican porcentajes sobre el total de ensayos para cada antibiótico.

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 todos los casos los **errores máximos** de interpretación (resultado obtenido en la categoría de sensible siendo resistente el valor asignado) fueron considerados como no aceptables por parte del Programa CCS.

## UTILIZACIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO

De los 93 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 76 (81,7%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 9 indicaron que sí lo habían empleado (9,7%) y otros 8 (8,6%) lo usaron parcialmente.

## COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

Algunos participantes (6 centros) recomendaron tratamiento con claritromicina, además de desbridamiento quirúrgico. Cinco centros comentaron que la cepa de *M. abscessus* presentaba resistencia inducible a la claritromicina, mientras que otros 3 centros comentaron que la tobramicina no se debe dar en infecciones por esta especie.

Por último, dos participantes especificaron que convendría enviar la cepa a un laboratorio externo de referencia para el estudio de sensibilidad.

Madrid, 11 de julio de 2016

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

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

**Programa de Control de Calidad SEIMC • Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**

c/ Agustín de Betancourt, 13. Entrepantana. 28003 Madrid • Tel: 91.5310990 • Fax: 91.5227505 • Correo electrónico: [ccs@seimc.org](mailto:ccs@seimc.org)