

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL MB-4/17

En el Análisis de Resultados del presente control se comentan 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 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 siembra de los tubos de Löwenstein-Jensen 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.

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 de 79 años que era remitido al neumólogo para control de su EPOC al presentar en el último mes un cuadro de reagudización que no había mejorado totalmente con tratamiento antibiótico. El paciente refería tos escasamente productiva y aumento de su disnea habitual que aparecía incluso a pequeños esfuerzos. No había presentado fiebre ni grave deterioro de su estado general. En la exploración, se objetivaba hipoventilación generalizada con escasos crepitantes bilaterales en ambas bases y tonos cardíacos rítmicos sin soplos. Se recogieron tres muestras de esputo que fueron remitidas al servicio de Microbiología para estudio bacteriológico y de micobacterias. A los 32 días de incubación creció, a partir del cultivo en medio líquido de una de las muestras, la micobacteria que era objeto de este control

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 empleado para el estudio comparativo fue el de *Mycobacterium lentiflavum*. Esta identificación de referencia se obtuvo mediante hibridación inversa (GenoType Mycobacterium AS de Hain Lifescience), y fue confirmada por secuenciación del ARN ribosómico 16S.

No se ha establecido un valor asignado para el estudio de sensibilidad (consenso de expertos) debido a que no existen puntos de corte para interpretación de las CMI en esta especie, por lo que el objeto del presente control era la identificación.

PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 101 centros inscritos a este control, de los que respondieron 93, todos ellos con resultados valorables, lo que supone un porcentaje de participación del 92,1%. Este porcentaje es similar al del último control de Micobacteriología, en el que se envió una cepa de *Mycobacterium gordonae* (95,0% de participación).

IDENTIFICACIÓN

El Programa de Control de Calidad aceptó únicamente como respuesta válida la identificación correcta de género y especie (*M. lentiflavum*). Como se puede observar en la tabla 1, la gran mayoría de los laboratorios (84, el 90,3%) identificaron correctamente la especie de la cepa remitida.

Tabla 1. Resultados de la identificación micobacteriana.

| Identificación | Número | % |
|---|--------|-------|
| <i>Mycobacterium lentiflavum</i> | 84 | 90,3 |
| Género <i>Mycobacterium</i> | 3 | 3,2 |
| <i>Mycobacterium</i> (no <i>M. tuberculosis</i>) | 3 | 3,2 |
| <i>Mycobacterium genavense</i> | 2 | 2,2 |
| <i>Mycobacterium szulgai</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, hubo 3 (3,2%) que no aportaron información al respecto, recurriendo todos ellos a un laboratorio externo.

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 (espectrometría de masas, inmunocromatografía, sonda, características morfo-culturales, PCR a tiempo real, PCR-RFLP ó secuenciación) por 48 participantes (51,6%). En segundo lugar, destaca la espectrometría de masas, que fue empleada por 40 laboratorios (43,0%). Respecto a la secuenciación, fue informada por 10 centros (10,8%). El conjunto de los métodos empleados queda reflejado en la tabla 2.

Tabla 2. Métodos utilizados en la identificación.

| Método | Número | % |
|--|--------|-------|
| Espectrometría de masas | 29 | 31,1 |
| Hibridación inversa | 28 | 30,1 |
| Hibridación inversa + espectrometría de masas | 7 | 7,5 |
| Secuenciación | 4 | 4,2 |
| Espectrometría de masas + secuenciación | 3 | 3,2 |
| Hibridación inversa + inmunocromatografía | 3 | 3,2 |
| Sonda + hibridación inversa | 3 | 3,2 |
| Hibridación inversa + características morfo-culturales | 2 | 2,2 |
| Hibridación inversa + PCR ^a a tiempo real | 2 | 2,2 |
| Oligocromatografía | 2 | 2,2 |
| Secuenciación + características morfo-culturales | 2 | 2,2 |
| Hibridación inversa + PCR-RFLP ^a | 1 | 1,1 |
| Hibr. inversa + PCR tiempo real + espectrometría masas | 1 | 1,1 |
| Hibridación inversa + secuenciación | 1 | 1,1 |
| Inmunocromatografía | 1 | 1,1 |
| Sonda | 1 | 1,1 |
| No informa | 3 | 3,2 |
| Total | 93 | 100,0 |

^aPCR: reacción en cadena de la polimerasa; RFLP: *restriction fragment length polymorphism*.

En cuanto a las marcas comerciales empleadas, predominó el uso de las tiras de hibridación inversa de GenoType Mycobacterium AS de Hain Lifescience (el 35,7% respecto al conjunto de las técnicas de identificación comerciales empleadas). Este porcentaje de utilización del GenoType AS podría ser mayor, ya que algunos centros no especificaron el *kit* de GenoType utilizado, mientras que otros refirieron haber empleado como único método las tiras de GenoType Mycobacterium CM o de GenoType NTM-DR, detectando alguno de ellos *M. lentiflavum* (especie que no se encuentra en la base de datos de estos dos sistemas).

A continuación, le siguen el MALDI-TOF de Bruker (33,3%) y el MALDI-TOF VITEK® MS (6,0%). Todos estos sistemas comerciales obtuvieron un excelente índice de aciertos para la identificación de la especie *M. lentiflavum*, con algunos errores ocasionales. La totalidad de las marcas empleadas se muestra en la tabla 3, mientras que la capacidad de los sistemas comerciales mayoritarios para identificar la cepa se resume en la tabla 4.

Tabla 3. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

| Método comercial | Número | % uso | % acierto |
|---|--------|-------|-----------|
| GenoType Mycobacterium AS (Hain) | 30 | 35,7 | 96,7 |
| MALDI-TOF (Bruker) | 28 | 33,3 | 100,0 |
| GenoType Mycobacterium CM (Hain) ^a | 8 | 9,4 | 50,0 |
| GenoType Mycobacterium (Hain) ^b | 5 | 6,0 | 100,0 |
| MALDI-TOF (VITEK® MS) | 5 | 6,0 | 100,0 |
| INNO-LiPA® (Fujirebio) | 2 | 2,4 | 50,0 |
| Speed-oligo® Mycobacteria (Vircell) | 2 | 2,4 | 50,0 |
| BD MGIT™ TBc (Becton Dickinson) | 1 | 1,2 | 0,0 |
| GenoType MTBC (Hain) ^a | 1 | 1,2 | 0,0 |
| GenoType NTM-DR (Hain) ^a | 1 | 1,2 | 100,0 |
| Espectrometría de masas sin especificar | 1 | 1,2 | 100,0 |
| Total | 84 | 100,0 | 89,3 |

^aEstos kits no permiten la detección de *M. lentiflavum*.

^bNo especifican el kit de GenoType utilizado.

Tabla 4. Resultados de identificación de *M. lentiflavum* con los sistemas comerciales más empleados^a.

| Sistema | Nº | <i>M. lentiflavum</i> | <i>M. genavense</i> | Género <i>Mycobacterium</i> |
|---------------------------|----|-----------------------|---------------------|--------------------------------|
| GenoType Mycobacterium AS | 30 | 29 (96,7) | 1 (3,3) | 0 |
| MALDI-TOF (Bruker) | 28 | 28 (100,0) | 0 | 0 |
| MALDI-TOF (VITEK® MS) | 5 | 5 (100,0) | 0 | 0 |
| INNO-LiPA® | 2 | 1 (50,0) | 1 (50,0) | 0 |
| Speed-oligo® Mycobacteria | 2 | 1 (50,0) | 0 | 1 (50,0) |

^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 84 centros que realizaron una identificación de *M. lentiflavum*. De ellos, tan sólo once (13,1%) realizaron estudio de sensibilidad. De los 73 laboratorios restantes, 19 informaron en sus comentarios que no procedía realizarlo, ya que *M. lentiflavum* no se consideraba patógeno o presentaba un significado clínico dudoso.

La técnica empleada mayoritariamente fue la microdilución, informada por 4 centros (36,4% de las respuestas con antibiograma), seguida de las tiras de gradiente de concentración, utilizadas por 3 centros (27,3%). La totalidad de los métodos empleados se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Métodos empleados en el antibiograma.

| Método | Número | % |
|--|--------|-------|
| Microdilución | 3 | 27,3 |
| Tira de gradientes de concentración | 2 | 18,1 |
| Dilución en medio líquido | 1 | 9,1 |
| Dilución en medio líquido + microdilución | 1 | 9,1 |
| Proporciones + tira de gradientes de concentración | 1 | 9,1 |
| No informa | 3 | 27,3 |
| Total | 11 | 100,0 |

En cuanto a los equipos comerciales empleados para la obtención de la CMI destaca, en primer lugar, el panel de microdilución de Sensititre®, que fue usado por 3 centros (27,3%), seguido de las tiras de E-test® de bioMérieux (18,1%). Hubo 3 participantes (27,3%) que no aportaron información acerca de la marca comercial. El conjunto de las marcas empleadas para el estudio de sensibilidad se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Marcas empleadas en el antibiograma.

| Marca | Número | % |
|---|--------|-------|
| Sensititre® (Thermo Scientific) | 3 | 27,3 |
| E-test® (bioMérieux) | 2 | 18,1 |
| BACTEC™ MGIT™ (Becton-Dickinson) | 1 | 9,1 |
| Oxoid (tiras de gradiente de concentración) | 1 | 9,1 |
| Fabricación propia | 1 | 9,1 |
| No informa | 3 | 27,3 |
| Total | 11 | 100,0 |

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 11 laboratorios que realizaron el antibiograma, 8 (72,7%) emplearon los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), y los 3 restantes (27,3%) según los publicados en la bibliografía. Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 7.

Tabla 7. Criterios seguidos para la interpretación de los resultados.

| Criterio | Número | % |
|--------------|--------|-------|
| CLSI | 8 | 72,7 |
| Bibliografía | 3 | 27,3 |
| Total | 11 | 100,0 |

Dado que no se dispone de valor asignado para el antibiograma, los resultados de los participantes que aparecen a continuación lo hacen sólo a modo informativo y sin efectos de comparación.

En la tabla 8 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 20 antibióticos diferentes, aunque únicamente la claritromicina fue informada por 10 participantes.

Tabla 8. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos

| Antibiótico | Nº | Categorización ^a | | | |
|----------------|----|-----------------------------|------------|------------|---------------|
| | | Sensible | Intermedio | Resistente | No interpreta |
| Claritromicina | 10 | 10 (100,0) | 0 | 0 | 0 |

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

UTILIZACIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO.

De los 93 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 82 (91,7%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, otros 9 (3,1%) indicaron que sí lo habían empleado, y otros 2 (5,2%) lo usaron parcialmente.

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

El comentario más frecuente (22 centros), como ya se ha mencionado, era que *M. lentiflavum* es una micobacteria ambiental, que no se consideraba patógena en adultos inmunocompetentes, y que había crecido únicamente en una de las tres muestras de esputo, por lo que era una probable colonización o contaminación, y no estaba indicado hacer su estudio de sensibilidad. Diez de estos centros recomendaron la recogida de otras muestras para valorar la significación clínica.

Hubo 2 centros que señalaron que no existían puntos de corte para la interpretación de las CMI en esta especie.

Madrid, 1 de junio de 2018



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.