

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL MB-2/18

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 varón de 57 años que presentaba una lesión inflamatoria y dolorosa de 1,5 cm de diámetro localizada en la base de la primera falange de su mano derecha. El paciente no tenía antecedentes patológicos de interés, ni relataba haber padecido ningún traumatismo importante previo en dicha localización, aunque era jardinero de profesión y sí que recordaba que en las semanas anteriores había tenido unos arañazos en la zona que ahora ocupaba la lesión. En el episodio actual, el área afectada presentaba un aspecto eritematoso, indurado y edematoso que no había respondido al tratamiento antibiótico habitual iniciado hacía tres semanas. Se decidió tomar muestras de la lesión, realizándose una escisión de la piel que permitió la salida de una pequeña cantidad de pus desde tejido celular subcutáneo y la obtención de una pequeña masa de tejido esponjoso grisáceo. Estas muestras fueron remitidas al servicio de Microbiología para estudio micobacteriológico, entre otros. A los cinco días, creció la micobacteria que fue 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 de referencia empleado para el estudio comparativo fue *Mycobacterium smegmatis*. Esta identificación de referencia se obtuvo mediante hibridación inversa (GenoType Mycobacterium AS de Hain Lifescience), y fue confirmada por secuenciación del ARN ribosómico 16S.

Los resultados de sensibilidad antibiótica del consenso de expertos (valor asignado) fueron obtenidos por microdilución con la placa Sensititre™ RAPMYCOI de ThermoFisher 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*) del documento M24-A2 correspondientes a las micobacterias de crecimiento rápido.

Tabla 1. Estudio de sensibilidad de consenso de expertos

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Categorización ^a
Cotrimoxazol	≤0,25 / 4,75	S
Linezólida	2	S
Ciprofloxacino	0,25	S
Imipenema	8	I
Moxifloxacino	≤0,25	S
Cefepima	>32	NI
Cefoxitina	64	I
Amoxicilina / clavulanato	16 / 8	NI
Amikacina	≤1	S
Ceftriaxona	>64	NI
Doxiciclina	≤0.12	S

^aS: sensible, R: resistente, I: intermedio, NI: no interpretada.

PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 101 centros inscritos a este control, de los que respondieron 94, todos ellos con resultados valorables, por lo que el porcentaje de participación es del 93,1%, ligeramente inferior al del último control de micobacterias (95,0%) en el que se envió una cepa de *M. tuberculosis*.

IDENTIFICACIÓN

El Programa de Control de Calidad SEIMC aceptó como respuesta válida la identificación correcta de género y especie *M. smegmatis*.

Como puede observarse en la tabla 2, el 73,4% de los centros aportó una identificación coincidente con el laboratorio de referencia, informando correctamente la especie.

Tabla 2. Resultados de la identificación micobacteriana.

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	69	73,4
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	10	10,6
Complejo <i>Mycobacterium fortuitum</i>	7	7,5
Complejo <i>M. fortuitum</i> / <i>M. chelonae</i>	2	2,1
Complejo <i>M. fortuitum</i> / <i>M. peregrinum</i>	2	2,1
Micobacteria no cromógena de crecimiento rápido	2	2,1
Género <i>Mycobacterium</i>	1	1,1
<i>Mycobacterium</i> (no <i>M. tuberculosis</i>)	1	1,1
Total	94	100,0

MÉTODOS Y MARCAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN

En cuanto a los métodos utilizados para la identificación, de los 94 centros que enviaron la hoja de respuesta, hubo tres de ellos (3,1%) que no aportaron información al respecto, recurriendo todos ellos a un laboratorio externo.

Las dos técnicas mayoritariamente empleadas por los participantes, usadas en solitario o bien combinadas junto con otro método, fueron la hibridación inversa (49 centros, el 52,1%), seguida de la espectrometría de masas (46 participantes, el 48,9%). Respecto a la secuenciación, fue requerida por 11 de los centros (11,7%). El conjunto de los métodos empleados se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados en la identificación.

Método	Número	%
Espectrometría de masas	28	29,7
Hibridación inversa	19	20,2
Hibridación inversa + espectrometría de masas	10	10,6

Hibridación inversa + PCR a tiempo real	8	8,5
Espectrometría de masas + secuenciación	6	6,3
Secuenciación	3	3,2
Sonda + hibridación inversa	3	3,2
Hibridación inversa + inmunocromatografía	2	2,1
Hibridación inversa + secuenciación	2	2,1
Espectrometría de masas + hibridación inversa + Bioquímica	1	1,1
Espectrometría de masas + sonda	1	1,1
Hibridación inversa + características morfo-culturales	1	1,1
Hibridación inversa + PCR-RFLP ^a	1	1,1
Inmunocromatografía	1	1,1
Oligocromatografía	1	1,1
Pruebas bioquímicas	1	1,1
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa	1	1,1
Sonda	1	1,1
Sonda + hibridación inversa + inmunocromatografía	1	1,1
No informa	3	3,1
Total	94	100,0

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

En cuanto a las marcas comerciales empleadas, hubo un predominio del MALDI-TOF de Bruker (36,8% respecto al conjunto de las técnicas de identificación comerciales empleadas). A continuación, le siguen las tiras de hibridación inversa GenoType Mycobacterium CM (23,0%) y GenoType Mycobacterium AS (19,6%), ambas de Hain Lifescience. El conjunto de todas las marcas comerciales empleadas se muestra en la tabla 4. Respecto a estas marcas utilizadas, hay que señalar que tanto las tiras GenoType Mycobacterium CM como las tiras GenoType MTBC no detectan la especie *M. smegmatis*. Del mismo modo, las sondas moleculares que se emplearon, las tiras de inmunocromatografía y el Speed-oligo® Mycobacteria de Vircell únicamente detectan el complejo *M. tuberculosis*.

Tabla 4. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Método comercial	Número	% uso	% acierto
MALDI-TOF (Bruker)	32	36,8	100,0

GenoType Mycobacterium CM (Hain) ^a	20	23,0	15,0
GenoType Mycobacterium AS (Hain)	17	19,6	100
INNO-LiPA® (Fujirebio)	5	5,7	60
MALDI-TOF (VITEK® MS)	5	5,7	100,0
GenoType MTBC (Hain) ^a	2	2,2	0,0
GenoType Mycobacterium (Hain) ^b	2	2,2	100,0
Accuprobe® (Gen-Probe®, bioMérieux)	1	1,2	0,0
BD MGIT™ TBc (Becton Dickinson)	1	1,2	0,0
Speed-oligo® Mycobacteria (Vircell) ^a	1	1,2	0,0
No informa ^c	1	1,2	100,0
Total	87	100,0	72,4

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

^bNo especifican el kit de GenoType utilizado.

^cIncluye espectrometría de masas (1).

En la tabla 5, se señala la capacidad de los sistemas comerciales mayoritarios para identificar la cepa remitida. Al analizar los sistemas comerciales que son capaces de detectar *M. smegmatis*, todos ellos obtuvieron un excelente índice de aciertos para la identificación de esta especie, con la excepción del INNO-LiPA (empleado sólo por cinco centros), en el que el porcentaje de aciertos alcanzó el 60,0%.

Tabla 5. Resultados de identificación de *M. smegmatis* con los sistemas comerciales más empleados^a.

Sistema	Nº	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. fortuitum</i>	Complejo <i>M. fortuitum</i>	Complejo <i>M. fortuitum</i> / <i>M. peregrinum</i>	Complejo <i>M. fortuitum</i> / <i>M. chelonae</i>
MALDI-TOF (Bruker)	32	32 (100,0)	0	0	0	0
GenoType Mycob. CM	20	3 (15,0) ^b	9 (45,0)	6 (30,0)	0	2 (10,0)
GenoType Myco. AS	17	17 (100,0)	0	0	0	0
INNO-LiPA® (Fujirebio)	5	3 (60,0)	0	0	2 (40,0)	0
MALDI-TOF VITEK MS	5	5 (100,0)	0	0	0	0

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

^bPara la identificación de especie se utilizaron, además, la espectrometría de masas o la PCR a tiempo real.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a los 69 centros que obtuvieron la identificación de *M. smegmatis*. De ellos 30 no realizaron el estudio fenotípico de sensibilidad, con lo que se analizaron un total de 39 antibiogramas.

Las técnicas mayoritarias fueron la microdilución, empleada por 23 centros (59,0% de las respuestas con antibiograma), seguida de las tiras de gradiente de concentración (13 centros, el 33,3%). La totalidad de los métodos empleados se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Métodos empleados en el antibiograma.

Método	Número	%
Microdilución	21	53,8
Tira de gradientes de concentración	10	25,6
Microdilución + tiras de gradientes de concentración	2	5,1
Disco-placa + tiras de gradientes de concentración	1	2,6
Proporciones	1	2,6
No informa	4	10,3
Total	39	100,0

En cuanto a los equipos comerciales empleados para la obtención de la CMI, destacan el panel de microdilución de Sensititre®, usado por 19 centros (el 48,7% que realizaron antibiograma), seguido de las tiras de E-test® de bioMérieux (11 centros, el 28,2%). Hubo 6 participantes (15,4%) que no aportaron información acerca de la marca comercial, de los cuales cinco remitieron el antibiograma a un centro externo. El conjunto de las marcas empleadas para el estudio de sensibilidad se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Marcas empleadas en el antibiograma.

Marca	Número	%
Sensititre™ (Thermo Scientific)	19	48,7
E-test® (bioMérieux)	11	28,2
MicroScan (Beckman Coulter)	2	5,1
Fabricación propia	1	2,6
No informa	6	15,4

Total	39	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 39 laboratorios que lo realizaron, 27 (69,2%) emplearon los criterios del CLSI, otros 4 (10,3%) informaron que emplearon criterios EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), y los 8 restantes (20,5%) criterios publicados en la bibliografía. Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 8.

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

Criterio	Número	%
CLSI	27	69,2
EUCAST	4	10,3
Bibliografía	8	20,5
Total	39	100,0

Se solicitó a los participantes que categorizaran el valor obtenido tal cual en su antibiograma (halo inhibición o CMI) y, en el caso de que quisieran realizar una lectura interpretada de los resultados para alguno de los antibióticos, que ésta la consignaran en el apartado de comentarios y no en la tabla de respuesta.

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 el estudio de sensibilidad, el Programa CCS considera como resultados **NO aceptables** los **errores máximos** de categorización (resultado obtenido en la categoría de sensible siendo el valor asignado resistente).

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 34 antibióticos diferentes, pero tan sólo 11 fueron informados por 10 o más participantes. Como se puede observar en dicha tabla, existe una excelente concordancia entre los laboratorios participantes y el valor asignado frente a la mayoría de los antimicrobianos ensayados, con la excepción de la cefoxitina, de la claritromicina y del imipenem. En el caso de la cefoxitina, en base al valor asignado, la cepa presentaba una CMI de 64 µg/mL (sensibilidad intermedia), pero pequeñas diferencias de dilución cambiarían la interpretación a sensible (CMI ≤16 µg/mL) o resistente (≥128 µg/mL). En cuanto a la claritromicina, *M. smegmatis* presenta una clara resistencia a los macrólidos, por lo que llama la atención que un 32,3% de los participantes informara la claritromicina como sensible. Y, por último, respecto al imipenem, según el valor asignado, la cepa presentaba una CMI de 8 µg/mL (sensibilidad intermedia) y se observó

cierta variabilidad de resultados, siendo informado este fármaco por los participantes, en un 20,6% como intermedio, y en un 64,7% como sensible, pero considerándose respuestas aceptables ya que constituyen errores menores.

Tabla 9. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos

Antibiótico	Nº	Categorización ^a			
		Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta
Amikacina	35	35 (100,0)	0	0	0
Cefoxitina	26	8 (30,8)	7 (26,9)	11 (42,3)	0
Ciprofloxacino	34	34 (100,0)	0	0	0
Claritromicina	31	10 (32,3)	0	20 (64,5)	1 (3,2)
Cotrimoxazol	27	26 (96,3)	0	1 (3,7)	0
Doxiciclina	31	31 (100,0)	0	0	0
Imipenema	34	22 (64,7)	7 (20,6)	5 (14,7)	0
Linezolida	34	34 (100,0)	0	0	0
Minociclina	12	12 (100,0)	0	0	0
Moxifloxacino	20	20 (100,0)	0	0	0
Tobramicina	23	22 (95,7)	1 (4,3)	0	0

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

UTILIZACIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO.

De los 94 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 81 (86,1%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 9 (9,6%) indicaron que sí lo habían empleado y otros 4 (4,3%) lo usaron parcialmente.

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

El principal comentario (9 centros) se refería a recomendaciones terapéuticas, principalmente desbridamiento quirúrgico junto con tratamiento combinado con dos fármacos, entre ellos doxiciclina, quinolonas, tobramicina, amikacina, cotrimoxazol o etambutol.

Cinco laboratorios comentaron que, de tratarse de una muestra clínica, habrían remitido la cepa a su centro de referencia para antibiograma, mientras que otro laboratorio señaló que el antibiograma informado se había enviado

a su centro de referencia, y otro centro comentaba que no había recibido todavía los resultados del antibiograma de su centro de referencia.

Madrid, 13 de octubre de 2018



C/ Agustín de Betancourt, 13
Entreplanta - 28003 Madrid
NIF: G-78387057



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.