

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL MB-1/19

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 a partir de una paciente de 55 años, sin antecedentes patológicos de interés, que consultaba por presentar un nódulo de hacía mes y medio de evolución en el dorso de la mano izquierda y pequeñas lesiones nodulares satélites en dedo anular de la misma mano. La lesión inicialmente había aparecido como una pápula de aspecto eritematoso sobre una herida superficial que se había hecho mientras limpiaba un acuario en la piscifactoría donde trabajaba. La herida, a pesar de que había sido correctamente desinfectada y de que había recibido tratamiento antibiótico, presentaba una evolución tórpida, con tendencia a la ulceración, y aparición posterior de pequeños nódulos satélites y adenopatías regionales. Se realizó una biopsia de la lesión principal, objetivándose una inflamación granulomatosa crónica no necrotizante; también se remitieron muestras del tejido al Servicio de Microbiología para cultivo de micobacterias. A los 12 días, se obtuvo, a partir de los medios líquidos y sólidos, 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 marinum*. Esta identificación de referencia se obtuvo mediante hibridación inversa y fue confirmada por secuenciación del ARN ribosómico 16S.

Los resultados de sensibilidad antibiótica del consenso de expertos (valor asignado) fueron obtenidos por microdilución y se muestran en la tabla 1. Se emplearon para la interpretación de los resultados los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) del documento M24-A2 correspondientes a *M. marinum*.

Tabla 1. Estudio de sensibilidad de consenso de expertos

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Categorización ^a
		CLSI (M24-A2-2011)
Amikacina	≤1	S
Ciprofloxacino	2	S
Claritromicina	0,12	S
Doxiciclina	1	S
Etambutol	4	S
Moxifloxacino	1	S
Rifampicina	≤0,12	S

^aS: sensible.

PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 101 centros inscritos a este control, de los que respondieron 93, todos ellos con resultados valorables, por lo que el porcentaje de participación es del 92,1%. Este porcentaje es similar al del último control de micobacterias, en el que se envió una cepa de *Mycobacterium kansasii* (89,1%), y también al del control MB-2/15, en el que también se remitió una cepa de *M. marinum* (89,6%).

IDENTIFICACIÓN

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

Como puede observarse en la tabla 2, la inmensa mayoría de los centros (90, el 96,8%) identificaron correctamente la especie. Hubo dos que respondieron *Mycobacterium ulcerans* (2,1%), mientras que el restante (1,1%) tan solo realizó una aproximación genérica.

Tabla 2. Resultados de la identificación micobacteriana.

Identificación	Número	%
----------------	--------	---

<i>Mycobacterium marinum</i>	90	96,8
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	2	2,1
Género <i>Mycobacterium</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, hubo dos de ellos (2,1%) que no aportaron información al respecto.

Las dos técnicas empleadas de forma mayoritaria por los participantes, usadas en solitario o bien en combinación, fueron la espectrometría de masas (46 centros, el 49,5%) y la hibridación inversa (42 centros, el 45,2%). Respecto a la secuenciación, fue realizada por 6 de los centros (6,5%). El conjunto de los métodos empleados se detalla en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados en la identificación.

Método	Número	%
Espectrometría de masas	36	38,7
Hibridación inversa	17	18,3
Hibridación inversa + PCR ^a a tiempo real	10	10,7
Hibridación inversa + espectrometría de masas	6	6,5
Sonda + hibridación inversa	4	4,3
Secuenciación	3	3,2
Espectrometría de masas + secuenciación	2	2,1
Hibridación inversa + características morfo-culturales	2	2,1
Oligocromatografía	2	2,1
Características morfológicas y culturales	1	1,1
Espectrometría de masas + bioquímica	1	1,1
Espectrometría de masas + sonda	1	1,1
Hibridación inversa + inmunocromatografía	1	1,1
Hibridación inversa + PCR-RFLP ^a	1	1,1
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa	1	1,1
Secuenciación + características morfo-culturales	1	1,1
Sonda + hibridación inversa + inmunocromatografía	1	1,1

Sonda + hibridación inversa + PCR ^a a tiempo real	1	1,1
No informa	2	2,1
Total	93	100,0

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

En cuanto a las marcas comerciales empleadas, en este control hubo un predominio del MALDI-TOF de Bruker (40,7% respecto del conjunto de los sistemas comerciales empleados), constatándose un claro incremento del uso del MALDI-TOF en micobacterias. Así, a modo de ejemplo, en el control MB-4/18, el porcentaje de utilización del MALDI-TOF de Bruker fue del 28,6%, frente al 40,7% del control actual. Respecto al resto de sistemas comerciales, destacan las tiras de hibridación inversa GenoType *Mycobacterium* CM de Hain Lifescience (40,7% del conjunto de las técnicas de identificación comerciales empleadas). Todos estos sistemas obtuvieron un excelente índice de aciertos para la identificación de la especie *M. marinum*. La totalidad de las marcas empleadas se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Método comercial	Número	% uso	% acierto
MALDI-TOF (Bruker)	35	40,7	100,0
GenoType <i>Mycobacterium</i> CM (Hain)	26	30,2	100,0
GenoType <i>Mycobacterium</i> AS (Hain) ^a	7	8,1	71,4
MALDI-TOF (VITEK® MS)	6	7,0	100,0
GenoType <i>Mycobacterium</i> (Hain) ^b	4	4,7	100,0
INNO-LiPA® (Fujirebio)	2	2,3	100,0
Speed-oligo® <i>Mycobacteria</i> (Vircell)	2	2,3	100,0
GenoType MTBC (Hain) ^a	1	1,2	100,0
GenoType NTM-DR (Hain) ^a	1	1,2	100,0
No informa ^c	2	2,3	100,0
Total	86	100,0	97,7

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

^bNo especifican el kit de GenoType utilizado.

^cMétodos empleados: espectrometría de masas (2).

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a los 90 centros que informaron *M. marinum*. De ellos 57 no realizaron el estudio fenotípico de sensibilidad, por lo que se analizaron un total de 33 antibiogramas.

Las técnicas mayoritarias fueron la microdilución (17 centros, el 51,5% de las respuestas con antibiograma), seguida de las tiras de gradientes de concentración (8 centros, el 24,2%). El conjunto de los métodos empleados se detalla en la tabla 5.

Tabla 5. Métodos empleados en el antibiograma.

Método	Número	%
Microdilución	16	48,5
Tiras de gradientes de concentración	6	18,2
Disco-placa + tiras de gradientes de concentración	2	6,1
Dilución en medio líquido + microdilución	1	3,0
Proporciones	1	3,0
No informa	7	21,2
Total	33	100,0

En cuanto a los equipos comerciales empleados para la obtención de la CMI, destaca el panel de microdilución de Sensititre™, usado por 15 centros (el 45,5% que realizaron antibiograma), seguido de las tiras de E-test® de bioMérieux (otros 6 centros, el 18,2%). Hubo 11 participantes (33,3%) que no aportaron información acerca de la marca comercial, de los cuales ocho remitieron el antibiograma a un centro externo. 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)	15	45,5
E-test® (bioMérieux)	6	18,2
MIC Test Strip (Liofilchem®)	1	3,0
No informa ^a	11	33,3
Total	33	100,0

^aMétodos: microdilución (2), proporciones (1), tiras de gradiente de concentración (1), no informado (7).

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 33 laboratorios que lo realizaron, 25 (75,8%) emplearon los criterios del CLSI, otros 4 (12,1%) informaron según criterios del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), mientras que hubo 3 centros (9,1%) que se basaron en criterios publicados en la bibliografía. Por último, hubo un centro (3,0%) que derivó la cepa a un

centro externo para la realización del antibiograma y que no informa de esta premisa. Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 7.

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

Criterio	Número	%
CLSI	25	75,8
EUCAST	4	12,1
Bibliografía	3	9,1
No informan	1	3,0
Total	33	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 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 27 antibióticos diferentes, pero tan solo 9 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 amikacina, claritromicina, etambutol y rifampicina. Sin embargo, en el resto de antituberculosos ensayados la concordancia es menor, sin asociarse a ningún método o marca en concreto.

Tabla 8. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos

Antibiótico	Nº	Categorización ^a				
		Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta	Evidencia insuficiente
Amikacina	30	30 (100,0)	0	0	0	0
Ciprofloxacino	15	9 (60,0)	0	6 (40,0)	0	0
Claritromicina	32	32 (100,0)	0	0	0	0
Cotrimoxazol	18	15 (83,3)	0	3 (16,7)	0	0
Doxiciclina	22	18 (81,8)	1 (4,6)	3 (13,6)	0	0

Etambutol	24	24 (100,0)	0	0	0	0
Linezolid	11	5 (45,5)	0	6 (54,5)	0	0
Moxifloxacino	14	12 (85,8)	1 (7,1)	1 (7,1)	0	0
Rifampicina	31	31 (100,0)	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, 81 (87,1%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 4 (4,3%) indicaron que sí lo habían empleado y los 8 restantes (8,6%) lo usaron parcialmente.

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

Once participantes comentaron que el estudio de sensibilidad no estaba indicado en *M. marinum*, salvo cuando había una mala respuesta al tratamiento.

Cinco centros comentaron que la prueba de hibridación inversa GenoType Mycobacterium CM de Hain no diferenciaba *M. marinum* de *M. ulcerans*. Otros cuatro centros realizaron recomendaciones terapéuticas, principalmente el tratamiento con claritromicina asociada a etambutol. Por último, dos centros señalaron que la cepa de micobacteria remitida era fotocromógena.

Madrid, 22 de julio de 2019




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 la tipificación de las cepas, necesaria para que desde el Programa se establezca el valor asignado a partir del consenso de resultados de dos laboratorios expertos. 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/IEC 17043, las actividades subcontratadas que afectan a los resultados de las pruebas solicitadas y a los estudios de homogeneidad y estabilidad 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.