

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOLOGÍA CONTROL M-2/21

En el Análisis de Resultados del presente control se comentan los resultados obtenidos en el estudio micológico de la muestra enviada para control externo. Se trató de un líofilo con el hongo a estudio, que había sido preparado por el Programa de Control de Calidad Externo SEIMC (Programa CCS) a partir de una cepa de reserva, la cual 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 la muestra a través de ensayos realizados tras la preparación de los líofilos 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, 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 el presente control se envió a los participantes un producto liofilizado con una única cepa. La historia clínica correspondía a la de un varón de origen sudafricano de 27 años, que se encontraba en nuestro país desde aproximadamente un año antes. En los 4 meses previos fue diagnosticado de infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH 1) y se inició tratamiento antirretroviral por bajo recuento de CD4 aproximadamente dos meses antes. Fue llevado a urgencias médicas de su hospital de área por presentar un cuadro febril de hacía varios días de evolución, que en las horas previas se acompañaba de deterioro rápido de su estado general y que, finalmente, determinó su ingreso. Como antecedentes de interés, el familiar que lo acompañaba relataba que el paciente, padecía, desde aproximadamente un mes antes, cefalea persistente de localización fronto-occipital y que en una ocasión tuvo un episodio de pérdida de la conciencia, no acompañado de convulsiones, pero sí de relajación de esfínteres. A la exploración, el paciente presentaba REG, fiebre termometrada de 39°C, y no se objetivaban signos de focalidad neurológica, ni signos meníngeos. Se realizó TAC cerebral y punción lumbar, y se remitió una muestra de líquido cefalorraquídeo al Servicio de Microbiología para estudio bacteriológico, micobacteriológico y de hongos, siendo la tinción de Gram positiva y creciendo a las 48 horas el hongo que fue objeto de este control.

Se solicitó a los laboratorios participantes la **identificación** del hongo implicado en este cuadro clínico, el **estudio de sensibilidad**, si procedía, así como que formularan los **comentarios** que consideraran oportunos.

M-2/21

VALOR ASIGNADO

La cepa fue identificada como *Cryptococcus neoformans* (valor asignado de referencia y empleado para el estudio comparativo). Esta identificación se realizó mediante estudio macro-microscópico de la cepa y espectrometría de masas (MALDI-TOF) y fue confirmada por secuenciación del ARN ribosómico 18S.

Los resultados de sensibilidad antibiótica de referencia fueron obtenidos mediante un panel comercial de microdilución complementado con tiras de gradiente de concentración y se muestran en la tabla 1. Como siempre, esta lista se incluye a título meramente informativo, como término de comparación para los participantes, sin que suponga una recomendación de uso en el tratamiento de las infecciones por esta levadura. Para la interpretación de los resultados, se emplearon los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) y del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) correspondientes a la especie *C. neoformans*.

Tabla 1. Valor asignado del estudio de sensibilidad.

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Categorización	
		EUCAST (V 10.0-2022)	CLSI (M59-2019)
Anfotericina B	0,25	S	S

S: Sensible / Sensible con dosificación estándar

PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 194 laboratorios participantes, de los que 175 remitieron hoja de respuesta, todos ellos con resultados valorables. Así, el porcentaje de participación real fue del 90,2%, similar al del último control de Micología (89,7%, un cultivo de *Trichophyton mentagrophytes*), y ligeramente superior a la del control M-1/20 (86,9%, un cultivo de *Candida glabrata*).

IDENTIFICACIÓN

El Programa de Control de Calidad SEIMC consideró como respuesta válida únicamente la identificación correcta de género y especie (*C. neoformans*). Como se puede observar en la tabla 2, la inmensa mayoría de los centros (97,7%) identificaron correctamente dicha especie.

Tabla 2. Resultados de la identificación micológica.

Identificación	Número	%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	171	97,7
<i>Cryptococcus gattii</i>	2	1,1
<i>Candida parapsilosis</i>	1	0,6
Género <i>Cryptococcus</i>	1	0,6
Total	175	100,0

M-2/21

MÉTODOS Y MARCAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN

Por lo que respecta a los métodos para la identificación, destaca la espectrometría de masas (realizada por 124 centros, el 70,9%), seguida de las pruebas bioquímicas (49 centros, el 28,0%). Dos centros (1,1%) realizaron un estudio de secuenciación para identificar la cepa. El conjunto de los métodos informados se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados en la identificación.

Método	Número	%
Espectrometría de masas	93	53,2
Cultivo + pruebas bioquímicas	21	12,0
Espectrometría de masas + cultivo	18	10,3
Características morfológicas + pruebas bioquímicas	8	4,5
Pruebas bioquímicas	8	4,5
Espectrometría de masas + pruebas bioquímicas	5	2,8
Estudio macro-microscópico + espectrometría masas	5	2,8
Microscopía + pruebas bioquímicas	5	2,8
Cultivo en medios cromogénicos	2	1,1
Cultivo + estudio macro-microscópico	1	0,6
Cultivo + microscopía	1	0,6
Cultivo cromogénico + pruebas bioquímicas	1	0,6
Espectrometría de masas + PCR a tiempo real	1	0,6
Espectrometría de masas + secuenciación	1	0,6
Espectrometría de masas + tinción azul lactofenol	1	0,6
PCR a tiempo real	1	0,6
Pruebas bioquímicas + incubación 42-45°C + cromogénico	1	0,6
Secuenciación	1	0,6
Tinta china	1	0,6
Total	175	100,0

Los sistemas comerciales basados en la espectrometría de masas, pruebas bioquímicas o pruebas moleculares utilizados para la identificación se muestran en la tabla 4. Los más empleados fueron el MALDI-TOF de Bruker,

informado por el 50,6% de los centros que emplearon un sistema comercial, seguido del MALDI-TOF VITEK® MS de bioMérieux (23,8%) y de la tarjeta VITEK®2 YST (16,5%), también de bioMérieux.

Tabla 4. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Método comercial	Número	% uso	% acierto
MALDI-TOF (Bruker)	83	50,6	100,0
MALDI-TOF (VITEK® MS)	39	23,8	94,9
VITEK®2 YST (bioMérieux)	27	16,5	100,0
Galerías API®:			
API® 20 C AUX (bioMérieux)	8	4,9	100,0
API® CANDIDA (bioMérieux)	1	0,6	100,0
MicroScan	3	1,8	67,0
RapID™ Yeast Plus (Remel, Thermo Scientific™)	2	1,2	100,0
FilmArray® (bioMérieux)	1	0,6	100,0
Total	164	100,0	98,2

La capacidad de los sistemas comerciales mayoritarios para identificar la cepa se resume en la tabla 5. Todos estos sistemas identificaron correctamente la cepa remitida.

Tabla 5. Resultados de identificación de *C. neoformans* con los sistemas comerciales más empleados.

Sistema	Número	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>	Género <i>Cryptococcus</i>
MALDI-TOF (Bruker)	83	83 (100,0)	0	0
MALDI-TOF (VITEK® MS)	39	37 (94,9)	2 (5,1)	0
VITEK®2 YST (bioMérieux)	27	27 (100,0)	0	0
API® 20 C AUX (bioMérieux)	8	8 (100,0)	0	0
MicroScan	3	2 (67,0)	0	1 (33,0)

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFUNGICOS

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a los 174 centros que realizaron una identificación mínima de género *Cryptococcus*. De ellos, 61 no realizaron el estudio de sensibilidad mientras que otros 3 centros no introdujeron ningún antifúngico en la nueva aplicación, por lo que se analizaron un total de 110 antifungigramas.

M-2/21

La tendencia mayoritaria fue determinar la CMI mediante microdilución en caldo, utilizada por el 86,4% de los participantes que realizaron antifungigrama y, de forma exclusiva, por el 81,8% de los mismos. En segundo lugar, destaca la determinación de la CMI mediante las tiras de gradiente de concentración, que fue efectuada por el 17,3% de los centros con antifungigrama (el 13,6% como único método). El conjunto de los métodos informados se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Métodos empleados en el antifungigrama.

Método	Número	%
Microdilución	90	81,8
Tira de gradientes de concentración	15	13,6
Microdilución + tiras de gradiente de concentración	4	3,7
Microdilución + disco-placa	1	0,9
Total	110	100,0

Respecto a las marcas empleadas para obtener las CMIs o las concentraciones críticas, el sistema comercial más utilizado fue el panel Sensititre™ (47,3%), seguido de la tarjeta VITEK® 2 AST (36,4%) y de las tiras de Etest® (11,8%), ambas de bioMérieux. En 2 ocasiones (1,8%) no se especificó la marca comercial empleada. El conjunto de las marcas empleadas se detalla en la tabla 7.

Tabla 7. Marcas empleadas en el antifungigrama.

Marca	Número	%
Sensititre™ (Thermo Scientific)	52	47,3
VITEK® 2 AST (bioMérieux)	40	36,4
Etest® (bioMérieux)	13	11,8
MIC Test Strip (Liofilchem®)	2	1,8
Micronaut (Merlin, Bruker)	1	0,9
No especifican ^a	2	1,8
Total	110	100,0

^aIncluyen microdilución (2).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS DE LOS PARTICIPANTES

Se solicitó a los participantes qué criterios de puntos de corte habían utilizado para la interpretación de su antifungigrama. Así, de los 110 laboratorios con la identificación mínima de género *Cryptococcus* que realizaron antifungigrama, 83 (75,5%) utilizaron los criterios del EUCAST, mientras que otros 27 centros (24,5%) se basaron en los criterios del CLSI. Estos datos se muestran en la tabla 8.

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

Criterio	Número	%
EUCAST	83	75,5
CLSI	27	24,5
Total	110	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 obtenidos para algún antifúngico que no se correspondiera con el patrón de resistencia intrínseca del microorganismo estudiado, 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 11 antifúngicos diferentes, de los cuales 10 se han informado por 10 o más participantes.

Tabla 9. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos.

Antibiótico	Nº	Categorización ^a				
		Sensible	Intermedio/ SEI/SDD	Resistente	No interpreta	Evidencia insuficiente
5-fluorocitosina	43	20 (46,5)	0	1 (2,3)	19 (44,2)	3 (7,0)
Anfotericina B	106	95 (89,6)	0	2 (1,9)	7 (6,6)	2 (1,9)
Anidulafungina	34	1 (2,9)	0	16 (47,1)	14 (41,2)	3 (8,8)
Caspofungina	44	2 (4,6)	0	24 (54,5)	15 (34,1)	3 (6,8)
Fluconazol	66	23 (34,8)	4 (6,1)	4 (6,1)	21 (31,8)	14 (21,2)
Isavuconazol	25	7 (28,0)	0	0	13 (52,0)	5 (20,0)
Itraconazol	36	14 (38,9)	0	1 (2,8)	13 (36,1)	8 (22,2)
Micafungina	37	2 (5,4)	0	19 (51,4)	14 (37,8)	2 (5,4)
Posaconazol	45	22 (48,9)	0	0	15 (33,3)	8 (17,8)
Voriconazol	62	34 (54,8)	0	0	18 (29,0)	10 (16,2)

M-2/21

^aLos números entre paréntesis indican porcentajes sobre el total de ensayos para cada antibiótico. Abreviaturas: SEI (Sensible con exposición incrementada). SDD (Sensible Dosis Dependiente).

De forma mayoritaria, los participantes mostraron unos resultados concordantes con el valor asignado para la anfotericina B. Algunos laboratorios no interpretaron los resultados cuantitativos obtenidos por no existir puntos de corte establecidos para algunos de los antifúngicos estudiados.

UTILIZACIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO

Por lo que respecta a la necesidad de utilizar un laboratorio externo para la identificación del hongo objeto del control o para el estudio de sensibilidad, de los 175 centros que emitieron un resultado evaluable 163 (93,1%) participantes comentaron no utilizarlo, otros 5 (2,9%) afirmaron el haberlo usado y los 7 restantes (4,0%) lo usaron parcialmente.

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

El principal comentario (13 centros) se refería a que EUCAST únicamente disponía de puntos de corte a la anfotericina B en *C. neoformans*. Así mismo, 6 centros realizaron recomendaciones terapéuticas, principalmente el tratamiento de inducción con anfotericina B más 5-fluorocitosina, seguido de tratamiento de consolidación con fluconazol. Hubo 3 centros que señalaron que *C. neoformans* era intrínsecamente resistente a las equinocandinas. Respecto a la identificación de la cepa, 2 centros señalaron que hubieran informado el complejo *C. neoformans* / *C. gattii*, mientras que otro centro comentó que la ausencia de crecimiento de la cepa en CGB (canavanina) hacía improbable que se tratase de *C. gattii*. Por último, dos centros señalaron que la cepa remitida correspondía a la variedad *C. neoformans* var. *grubii*.

Madrid, 20 de marzo de 2022



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.

M-2/21

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, y los estudios de homogeneidad y estabilidad de las muestras levaduriformes 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/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.