

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL MB-3/22

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 micobacteria sembrada en medio de Löwenstein-Jensen. La cepa había sido aislada en una mujer de 67 años, que fue remitida por su médico de familia a consultas externas de Neumología por presentar desde hacía mes y medio, un cuadro de tos con escasa expectoración de predominio matutino, cierta astenia y ligera disminución de peso. Como antecedentes de interés destacaba que era fumadora de 10 cigarrillos/día y que había sido diagnosticada de EPOC leve-moderado desde hacía 3 años. La paciente relataba un aumento de su disnea habitual en la última semana, que era patente a pequeños-medianos esfuerzos. La sintomatología no había mejorado, después de cumplimentar dos fases de tratamiento antibiótico y no se habían obtenido resultados microbiológicos significativos de las muestras de esputo remitidas. A la auscultación, se objetivaba disminución del murmullo vesicular en ambos campos pulmonares y crepitantes basales; en la radiografía de tórax se observaban bronquiectasias bibasales y una pequeña zona de cavitación en llingula. Se decidió programar una fibrobroncoscopia y se tomó una muestra de BAS y lavado broncoalveolar que fueron remitidas al Servicio de Microbiología para cultivo bacteriológico y estudio de micobacterias, aislándose a los 12 días de incubación 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.

MB-3/22

VALOR ASIGNADO

El valor asignado de referencia empleado para el estudio comparativo fue el de *Mycobacterium intracellulare*. 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 mediante un panel comercial de microdilución 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 al complejo *Mycobacterium avium*.

Tabla 1. Estudio de sensibilidad de referencia (valor asignado).

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Categorización ^a
		CLSI (M62-1st ed-2018)
Amikacina	8	S
Claritromicina	2	S
Linezolid	16	I
Moxifloxacino	2	I

^aS: sensible, I: intermedio.

PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 99 centros inscritos a este control, de los que respondieron 95, todos ellos con resultados valorables, por lo que el porcentaje de participación fue del 96,0%. Este porcentaje es idéntico al del último control de Micobacteriología, en el que se envió una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* (96,0% de participación) y muy similar al del control MB-1/22, en el que se remitió una cepa de *Mycobacterium fortuitum* (95,0% de participación).

IDENTIFICACIÓN

El Programa de Control de Calidad SEIMC aceptó como respuesta óptima la identificación de especie *M. intracellulare*, y consideró como aceptables las identificaciones de complejo *Mycobacterium avium*, *M. chimarea*/*Mycobacterium chimaera intracellulare* grupo, por la cercanía genotípica y fenotípica entre las especies que componen dicho grupo. Como puede observarse en la tabla 2, 69 centros (72,6%) respondieron *M. intracellulare*, 23 participantes (24,2%) informaron *Mycobacterium chimaera* y 3 (3,2%) laboratorios identificaron la cepa como complejo *M. avium*, siendo el porcentaje global de identificaciones aceptadas del 100%, aunque el porcentaje de respuestas óptimas con identificación correcta de género y especie fue del 72,6%.

MB-3/22

Tabla 2. Resultados de la identificación micobacteriana.

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	69	72,6
<i>Mycobacterium chimaera</i>	23	24,2
Complejo <i>Mycobacterium avium</i>	3	3,2
Total	95	100,0

MÉTODOS Y MARCAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN

En cuanto a los métodos utilizados para la identificación, de los 95 centros que enviaron la hoja de respuesta, hubo 4 de ellos (4,2%) que no aportaron información al respecto, recurriendo todos ellos a un laboratorio externo. La técnica empleada mayoritariamente por los participantes fue la espectrometría de masas que fue usada, bien en solitario o bien combinada con otro método (hibridación inversa, secuenciación, o inmunocromatografía) por 52 de los centros (54,7%). A continuación, le siguen la hibridación inversa (43 centros, el 45,3%), la PCR a tiempo real (6 centros, el 6,3%), la secuenciación (5 centros, 5,3%), el Liquid Array® (2 centros, el 2,1%), las características morfológicas y culturales de la cepa (1 centro, el 1,1%), la oligocromatografía (1 centro, el 1,1%) y las pruebas bioquímicas (1 centro, el 1,1%). El conjunto de los métodos empleados para la identificación queda reflejado en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados en la identificación.

Método	Número	%
Espectrometría de masas	39	41,0
Hibridación inversa	25	26,3
Espectrometría de masas + hibridación inversa	10	10,5
Hibridación inversa + PCR a tiempo real	6	6,3
Secuenciación	3	3,1
Espectrometría de masas + secuenciación	2	2,1
Liquid Array®	2	2,1
Espectrometría de masas + inmunocromatografía	1	1,1
Hibridación inversa + características morfo-culturales	1	1,1
Oligocromatografía	1	1,1
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa	1	1,1
No informa	4	4,2

MB-3/22

Total 95 100,0

^aPCR: reacción en cadena de la polimerasa.

En cuanto a las marcas comerciales empleadas, hubo un predominio del MALDI-TOF de Bruker (39,1% respecto al conjunto de las técnicas de identificación comerciales empleadas), seguido de las tiras de hibridación inversa GenoType *Mycobacterium* CM de Hain (28,7%). La totalidad de las marcas comerciales empleadas se muestra en la tabla 4. Es importante indicar que con el kit GenoType *Mycobacterium* CM de Hain, *M. chimaera* (incluido en el complejo *M. avium*) muestra el mismo patrón de bandas que *M. intracellulare*, por lo que para diferenciar entre *M. intracellulare* y *M. chimaera* hay que utilizar el kit GenoType NTM-DR. Hay que señalar que las tiras de hibridación inversa GenoType *Mycobacterium* AS y la inmunocromatografía BD MGITTMTBc no detectan el complejo *M. avium* ni ninguna de las especies que lo forman.

Tabla 4. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Método comercial	Número	% uso	% acierto
MALDI-TOF (Bruker)	34	39,1	35,3
GenoType <i>Mycobacterium</i> CM (Hain, Bruker)	25	28,7	100,0
MALDI-TOF (VITEK® MS)	10	11,5	90,0
GenoType NTM-DR (Hain)	9	10,3	100,0
INNO-LiPA® (Fujirebio)	4	4,6	75,0
FluoroType® (Hain, Bruker)	2	2,3	100,0
BD MGIT TM TBc (Becton Dickinson) ^a	1	1,1	0,0
GenoType <i>Mycobacterium</i> AS (Hain) ^a	1	1,1	100,0
Speed-oligo® <i>Mycobacteria</i> (Vircell)	1	1,1	100,0
Total	87	100,0	71,3

^aEste equipo no permite la detección del complejo *M. avium*.

En la tabla 5, se señala la capacidad de los sistemas comerciales mayoritarios para identificar la cepa remitida. Todos los sistemas comerciales capaces de detectar *M. intracellulare* obtuvieron un excelente índice de aciertos para la identificación de esta especie. Sin embargo, en el caso de MALDI-TOF de Bruker, llama la atención que más de la mitad de los centros (58,8%) que lo utilizaron respondieron *M. chimaera*. Uno de ellos indicó en sus comentarios que lo había identificado como *Mycobacterium chimaera intracellulare* grupo.

Tabla 5. Resultados de identificación de *M. intracellulare* con los sistemas comerciales más empleados.

Sistema	Número	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>	Complejo <i>M. avium</i>
MALDI-TOF (Bruker)	34	12 (35,3)	20 (58,8)	2 (5,9)
GenoType <i>Mycobacterium</i> CM (Hain)	25	25 (100,0)	0	0
MALDI-TOF (VITEK® MS)	10	9 (90,0)	1 (10,0)	0
GenoType NTM-DR (Hain)	9	9 (100,0)	0	0
INNO-LiPA® (Fujirebio)	4	3 (75,0)	0	1 (25,0)
FluoroType® (Hain)	2	2 (100,0)	0	0

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a los 95 centros que obtuvieron la identificación del complejo *M. avium* o de alguna de las especies que lo componen. De ellos, 40 no realizaron el estudio fenotípico de sensibilidad, mientras que hubo otros 9 centros que no introdujeron ningún antibiótico en la aplicación, por lo que se analizaron un total de 46 antibiogramas.

La técnica más utilizada fue la microdilución, empleada por 29 centros (63,0% de las respuestas con antibiograma), seguida de las tiras de gradiente de concentración (8 centros, el 17,4%). La totalidad de los métodos empleados se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Métodos empleados en el antibiograma.

Método	Número	%
Microdilución	27	58,7
Tiras de gradiente de concentración	7	15,2
Dilución en medio líquido	4	8,7
Dilución en medio líquido + microdilución	1	2,2
Tira de gradientes de concentración + microdilución	1	2,2
No informa	6	13,0
Total	46	100,0

En cuanto a los equipos comerciales empleados para la obtención de la CMI, destacan el panel de microdilución de Sensititre™, usado por 27 centros (el 61,4% que realizaron antibiograma con un sistema comercial), seguido de las tiras de Etest® de bioMérieux (6 centros, el 13,7%). Hubo 7 participantes (15,9%) que no aportaron información

MB-3/22

acerca de la marca comercial, remitiendo todos ellos 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™ (ThermoScientific)	27	61,4
Etest® (bioMérieux)	6	13,7
BACTEC™ MGIT™ (Becton Dickinson)	2	4,5
MIC Test Strip (Liofilchem®)	2	4,5
No informa ^a	7	15,9
Total	44	100,0

^aMétodos: dilución en medio líquido (1), no informa (6).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS DE LOS PARTICIPANTES

En cuanto a los puntos de corte utilizados para la interpretación de las CMI obtenidas, de los 46 laboratorios que lo realizaron, hubo 36 (78,3%) que emplearon los criterios de CLSI, otros 4 (8,7%) indicaron haber utilizado los criterios de EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), y otro centro (2,2%) usó los datos publicados en la bibliografía. Por último, hubo 5 participantes (10,8%) que enviaron la cepa a un centro externo y no informaron de esta premisa. Cabe resaltar con respecto a los cuatro centros que indicaron la utilización de criterios EUCAST, que hasta el momento, no hay definidos puntos de corte en micobacterias para dichos antibióticos. Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 8.

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

Criterio	Número	%
CLSI	36	78,3
EUCAST	4	8,7
Bibliografía	1	2,2
No informan	5	10,8
Total	46	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.

MB-3/22

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 17 antibióticos diferentes, pero tan solo 8 fueron informados por 10 o más participantes.

Tabla 9. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos.

Antibiótico	Nº	Categorización ^a				
		Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta	Evidencia insuficiente
Amikacina	41	34 (82,9)	0	4 (9,8)	3 (7,3)	0
Ciprofloxacino	16	3 (18,7)	0	11 (68,8)	2 (12,5)	0
Claritromicina	46	45 (97,8)	0	1 (2,2)	0	0
Etambutol	15	5 (33,3)	0	3 (20,0)	7 (46,7)	0
Linezolid	40	13 (32,5)	8 (20,0)	17 (42,5)	2 (5,0)	0
Moxifloxacino	31	10 (32,3)	11 (35,5)	8 (25,8)	2 (6,4)	0
Rifabutina	12	5 (41,7)	0	0	7 (58,3)	0
Rifampicina	17	4 (23,5)	0	5 (29,4)	8 (47,1)	0

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

Como se puede observar en dicha tabla, existe concordancia entre la mayoría de los laboratorios participantes y el valor asignado para la claritromicina para la amikacina. Sin embargo, en el caso del linezolid y del moxifloxacino se observó una mayor dispersión de resultados entre los centros: en el caso del linezolid, en base al valor asignado, la cepa presenta una CMI de 16 µg/mL (intermedio), pero diferencias en una dilución ya cambiarían la interpretación a resistente (CMI ≥32 µg/mL); del mismo modo, la cepa presenta una CMI al moxifloxacino de 2 µg/mL (intermedio) según el valor asignado, pero diferencias en una dilución cambiarían la interpretación a resistente (CMI ≥4 µg/mL) o incluso a sensible (CMI ≤1 µg/mL), lo que puede explicar la variabilidad de los resultados.

UTILIZACIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO.

De los 95 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 77 (81,1%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 11 (11,6%) indicaron que sí lo habían empleado, y otros 7 (7,3%) lo usaron parcialmente.

MB-3/22

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

Seis centros indicaron que no detectaron ninguna mutación de resistencia para macrólidos (*rrl*) ni para aminoglucósidos (*rrs*). Cinco centros comentaron que el MALDI-TOF de Bruker y las tiras de hibridación Genotype *Mycobacterium* CM no diferenciaban *M. intracellulare* de *M. chimarea*. Respecto al tratamiento, tres centros recomendaron tratar con macrólidos, etambutol y rifampicina.

Por último, 6 laboratorios mencionaron que el antibiograma informado se había enviado a un centro externo, mientras que otros 5 centros señalaron que en caso de ser una muestra clínica el antibiograma se habría remitido a un centro externo.

Madrid, 1 de diciembre 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.

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.

MB-3/22