

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL MB-2/15

INTRODUCCIÓN

En este control se envió a los distintos laboratorios participantes una cepa de *Mycobacterium marinum*, la muestra se remitió sembrada en un tubo con medio de Löwenstein-Jensen. El valor asignado de referencia para la muestra fue de *Mycobacterium marinum* y se obtuvo mediante hibridación inversa (INNO-LiPA® Mycobacteria de Fujirebio) y posterior estudio de secuenciación del ARN ribosómico 16S.

La micobacteria había sido aislada de un paciente varón de 24 años de edad sin antecedentes patológicos de interés, que presentaba desde hacía tres semanas una lesión ulcerada de tamaño medio, junto con eritema y edema, en el dorso del pie izquierdo. El paciente relataba que la lesión se produjo por un traumatismo contra una roca mientras practicaba deportes acuáticos. La evolución de la herida había sido tórpida a pesar de ser tratada con bacitracina desde hacía unos 7 días. A la exploración, se observó una lesión nodular ulcerada, bien delimitada y cubierta por una costra hemorrágica con ligera exudación sero-sanguinolenta. La palpación objetivó otras dos lesiones nodulares que seguían un trayecto lineal a lo largo de la cadena linfática junto con edema y aumento de la temperatura local de la zona. Se tomaron muestras de la lesión que fueron remitidas al Servicio de Microbiología para estudio bacteriológico y de micobacterias, creciendo a los 15 días la micobacteria que fue el 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.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN EN MICOBACTERIOLOGÍA

La cepa problema fue enviada a los 106 centros inscritos, de los que 96 remitieron la hoja de respuesta. Un centro no identificó la cepa comentando que se debía a una avería de su equipo, por lo que hubo 95 respuestas con resultados valorables, lo que supone un porcentaje de participación del 89,6%. Este porcentaje es idéntico al del último control de Micobacteriología en el que se envió una cepa de *Mycobacterium gordonae* (control MB-1/15), y similar al del control MB-1/12, en el que también se remitió una cepa de *M. marinum* (la participación en dicho control fue del 87,0%).

El Programa de Control de Calidad sólo aceptó como respuesta válida la identificación correcta de género y especie (*M. marinum*). Como se puede observar en la tabla 1, la inmensa mayoría de los laboratorios (92,6%) identificaron correctamente la especie.

Tabla 1. Resultados de la identificación de la cepa.

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium marinum</i>	88	92,6
<i>Mycobacterium</i> (no <i>M. tuberculosis</i>)	4	4,2
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	2	2,1
Género <i>Mycobacterium</i>	1	1,1
Total	95	100,0

Por lo que respecta a los métodos utilizados para la identificación, de los 95 centros que enviaron hoja de respuesta con respuestas analizables, fueron tres los participantes (3,2%) que no aportaron información al respecto, de los cuales todos recurrieron 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 otros métodos (espectrometría de masas, pruebas bioquímicas, características morfo-culturales o PCR-RFLP), por 59 participantes (62,1%). En segundo lugar destaca la espectrometría de masas, que fue empleada por 21 laboratorios (22,1%). Respecto a las sondas moleculares, fueron usadas por 10 centros (10,5%), en todos los casos junto a otros métodos moleculares o pruebas bioquímicas. En este control, las pruebas bioquímicas clásicas sólo fueron informadas en 3 ocasiones (3,2%) y siempre junto a otros métodos. El conjunto de los métodos empleados queda reflejado en la tabla 2.

Tabla 2. Métodos utilizados para la identificación.

Método	Número	%
Hibridación inversa	28	29,5
Espectrometría de masas	15	15,8
Sonda + hibridación inversa	7	7,4
Hibridación inversa + PCR ^a a tiempo real	6	6,3
Hibridación inversa + espectrometría de masas	4	4,2
Inmunocromatografía	4	4,2
Oligocromatografía	4	4,2
Hibridación inversa + inmunocromatografía	4	4,2
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa	3	3,2
Secuenciación + Características morfo-culturales	3	3,2
Características morfológicas y culturales	2	2,1
Hibridación inversa + Características morfo-culturales	2	2,1
Secuenciación	2	2,1
Sonda + Hibridación inversa + Inmunocromatografía	2	2,1
Espectrometría de masas + Hibridación inversa + Secuenciación	1	1,0
Espectrometría de masas + Secuenciación	1	1,0
Hibridación inversa + Fotoinducción	1	1,0
Hibridación inversa + PCR-RFLP ^a	1	1,0
Hibridación inversa + Secuenciación	1	1,0
PCR a tiempo real	1	1,0
Sonda + Inmunocromatografía	1	1,0
No informa	3	3,2
Total	95	100,0

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

En cuanto a las marcas comerciales empleadas, los centros que informaron una técnica de hibridación inversa usaron el equipo comercial GenoType® *Mycobacterium* CM de Hain (50,5%), seguido del INNO-LiPA® de Fujirebio (9,3%). Ambas marcas mostraron un excelente índice de aciertos (98,0% y 100,0%, respectivamente). El resultado discordante obtenido con el equipo GenoType® *Mycobacterium* CM correspondía a un centro que informó *Mycobacterium ulcerans*, si bien, dicho centro especificó en sus comentarios que este método no podía discriminar entre *M. marinum* y *M. ulcerans*. Varios participantes comentaron que para poder diferenciar estas dos especies utilizaron el GenoType® *Mycobacterium* AS de Hain (que identifica *M. ulcerans* pero no *M. marinum*), o bien, se basaron en los aspectos epidemiológicos y clínicos del caso junto a las características de la colonia de la micobacteria (velocidad de crecimiento y fotoinducción), o bien, utilizaron otro método como la espectrometría de masas o la secuenciación.

Hubo 21 centros (22,1%) que emplearon el Maldi-TOF (Bruker o Vitek MS), de los que todos identificaron correctamente la cepa como *M. marinum*. Respecto al Speed-Oligo® *Mycobacteria* de Vircell, de los

4 centros que la emplearon, 3 identificaron correctamente la especie mientras que el cuarto centro informó *M. ulcerans*, comentando también que este sistema comercial no podía discriminar entre *M. marinum* y *M. ulcerans*. La totalidad de las marcas empleadas se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Método comercial	Número	% uso	% acierto
GenoType® <i>Mycobacterium</i> (Hain)	49	50,5	98,0
Maldi-TOF (Bruker / Vitek)	21	21,6	100,0
INNO-LiPA® (Fujirebio)	9	9,3	100,0
Manual ^a	6	6,2	100,0
Speed-Oligo® <i>Mycobacteria</i> (Vircell)	4	4,2	75,0
Becton-Dickinson ^b	2	2,1	0,0
Accuprobe® (Gen-probe, bioMérieux) ^c	1	1,0	100,0
Cepheid ^c	1	1,0	0,0
Standard Diagnostics ^c	1	1,0	0,0
No informa	3	3,1	100,0
Total	97	100,0	93,8

^aSe incluyen: pruebas bioquímicas, características morfo-culturales, RFLP y secuenciación.

^bInmunocromatografía para la detección de *M. tuberculosis*.

^cUtilizadas junto con la hibridación inversa.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICOBACTERIANOS

GENERALIDADES

El estudio de sensibilidad fue realizado por tan solo 27 (28,4%) de los 95 centros que enviaron la hoja de respuesta con resultado evaluable (tabla 4). La técnica mayoritaria fue la microdilución en caldo, realizada por 14 centros (el 51,9% de las respuestas con antibiograma, 44,5% como método único). Siete centros (25,9%) utilizaron tiras de E-test®, 3 (11,1%) la dilución en medio líquido y otros 2 (7,4%) el disco-placa. Finalmente, cinco participantes (18,5%) no aportaron datos sobre el método empleado.

Tabla 4. Métodos empleados en el estudio de sensibilidad.

Método	Número	%
Microdilución	12	44,5
E-test®	5	18,5
Dilución en medio líquido	1	3,7
Dilución en medio líquido + E-test®	1	3,7
Dilución en medio líquido + microdilución	1	3,7
Disco-placa + E-test®	1	3,7
Disco-placa + microdilución	1	3,7
No informa	5	18,5
Total	27	100,0

En cuanto a los equipos comerciales empleados, destacan, en primer lugar, el panel de microdilución de Sensititre™, que fue usado por 12 centros (41,4%). A continuación le siguen las tiras de E-test® de bioMérieux (7 centros, 24,1%), mientras que hubo 2 participantes (6,9%) que realizaron dilución mediante el sistema automatizado Bactec® MGIT 960 de Becton-Dickinson. Hubo 5 centros (17,3%) que no aportaron información acerca de la marca comercial, de los cuales todos remitieron la cepa a un centro externo para realizar el estudio de sensibilidad. El conjunto de las marcas empleadas para el estudio de sensibilidad se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Marcas empleadas en el estudio de sensibilidad.

Marca	Número	%
Sensititre™	12	41,4
bioMérieux	7	24,1
Bactec® MGIT 960 (Becton-Dickinson)	2	6,9
Manual ^a	3	10,3
No informa	5	17,3
Total	29	100,0

^aIncluye disco-placa (n=2) y microdilución (n=1).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS

En cuanto a los criterios de puntos de corte utilizados para la interpretación del antibiograma, de los 27 laboratorios que realizaron un antibiograma de micobacterias, 19 (70,4%) emplearon los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), 4 laboratorios (14,8%) los publicados en la bibliografía, y un único laboratorio (3,7%) siguió los criterios del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Por último, hubo 2 laboratorios (7,4%) que recibieron el resultado del antibiograma de su centro de referencia desconociendo qué criterios había utilizado éste, mientras que otro centro (3,7%) no aportó información al respecto. Todos estos datos se resumen en la tabla 6 de la página siguiente.

Tabla 6. Criterios seguidos para la interpretación de los resultados.

Marca	Número	%
CLSI	19	70,4
Bibliografía	4	14,8
Antibiograma en centro de referencia	2	7,4
EUCAST	1	3,7
No informa	1	3,7
Total	27	100,0

En la tabla 7 se muestran los resultados de sensibilidad de referencia para este control. Éstos se obtuvieron mediante microdilución con el sistema comercial Sensititre™ y se utilizaron los criterios interpretativos del CLSI.

Tabla 7. Resultados de sensibilidad de referencia.

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Interpretación ^a
Doxiciclina	4	S

Etambutol	1	S
Moxifloxacino	≤0,12	S
Ciprofloxacino	0,5	S
Cotrimoxazol	0,5	S
Amikacina	1	S
Claritromicina	0,12	S
Rifabutina	0,5	S
Rifampicina	≤0,12	S

^aSensible

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 25 antibióticos diferentes. Como se observa en dicha tabla, existe una excelente concordancia entre los laboratorios participantes y el valor asignado de referencia, en cuanto a la sensibilidad de la cepa frente a la amikacina, claritromicina, rifampicina, etambutol y moxifloxacino y, una menor concordancia en el caso de ciprofloxacino, doxiciclina y cotrimoxazol.

Tabla 8. Distribución de los resultados de sensibilidad.

Antimicrobiano	Sensible	Intermedio	Resistente	Total	Concordancia (%)
Amikacina	18	-	-	18	100,0
Ciprofloxacino	10	-	2	12	83,4
Claritromicina	23	-	-	23	100,0
Cotrimoxazol	8	-	8	16	50,0
Doxiciclina	14	-	3	17	82,4
Etambutol	21	-	2	23	91,3
Moxifloxacino	9	1	-	10	90,0
Rifampicina	25	-	1	26	96,2

UTILIZACIÓN DE LABORATORIO EXTERNO

De los 95 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 82 (86,3%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo, 6 centros indicaron que sí lo habían utilizado (6,3%) y otros 7 (7,4%) lo utilizaron parcialmente.

COMENTARIOS

Doce participantes comentaron que el estudio de sensibilidad no estaba indicado en *M. marinum* salvo cuando había una mala respuesta al tratamiento. Seis comentarios se refirieron a recomendaciones terapéuticas, principalmente el tratamiento con claritromicina y etambutol. Por último, cinco centros comentaron que la prueba de hibridación inversa no diferenciaba *M. marinum* de *M. ulcerans*.

Madrid, 30 de enero de 2016

El Coordinador del Programa de Control de Calidad SEIMC

Nota: La asignación del valor de referencia ha sido subcontratada a laboratorios externos.

Nota: Si los datos anteriores son incorrectos, o considerasen oportuno apelar los resultados rogamos se dirijan a la Secretaría del Programa