

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL MB-1/17

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 una micobacteria en medio de Löwenstein-Jensen. La micobacteria había sido aislada de una mujer de 64 años, fumadora de un paquete y medio de cigarrillos/día y hábito enólico moderado, que era remitida a la consulta de Neumología por presentar un cuadro de 15 días de evolución de febrícula vespertina, sensación disneica leve y tos persistente, que no había mejorado a pesar de tratamiento antibiótico con amoxicilina-clavulánico. Como antecedentes médicos de interés, la paciente había presentado en los 20 días previos, un episodio muy leve de hemoptisis en una de las expectoraciones. No refería dolor torácico asociado. A la exploración, se auscultaban crepitantes pulmonares en ambas bases. La radiografía de tórax mostraba una pequeña zona de condensación, pero también una extensa área de bronquiectasias quísticas. Se recogieron muestras de esputo que se remitieron a Microbiología para estudio bacteriológico y de micobacterias. A los 4 días de incubación, los cultivos de las muestras en medio líquido de micobacterias fueron positivos, aislándose la cepa 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 y empleado para el estudio comparativo fue *Mycobacterium abscessus* (*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*). Esta identificación se obtuvo mediante hibridación inversa (GenoType Mycobacterium CM y GenoType NTM-DR, ambos 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 en caldo con el sistema comercial Sensititre™ y se muestran en la tabla 1. Para la interpretación de los resultados se emplearon los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) correspondientes a las micobacterias de crecimiento rápido.

Tabla 1. Estudio de sensibilidad de consenso de expertos.

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Categorización ^a
Cefoxitina	128	R
Imipenem	>64	R
Ciprofloxacino	>4	R
Moxifloxacino	>8	R
Amikacina	4	S
Claritromicina	8	R
Cotrimoxazol	>152/8	R
Doxiciclina	>16	R
Minociclina	>8	R

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

La CMI de la claritromicina fue de 0,125 µg/mL (sensible) a los 3 días incubación, frente a la CMI de 8 µg/mL (resistente) de la lectura efectuada a los 14 días de incubación. La PCR mediante hibridación inversa de dicha cepa mostraba que poseía el gen *erm(41)* con una mutación C–T en la posición 28, lo que le confiere resistencia inducible a los macrólidos.

PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 101 centros inscritos a este control, de los que respondieron 92, todos ellos con resultados valorables, por lo que el porcentaje de participación fue del 91,1%. Este porcentaje es superior al del último control de Micobacteriología, en el que se envió una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* (86,8% de participación) y al del control MB-3/15, en el que también se remitió un *M. abscessus* (la participación fue del 87,7%).

IDENTIFICACIÓN

El Programa de Control de Calidad SEIMC aceptó como óptima la identificación de especie *M. abscessus*, y como aceptables las de *Mycobacterium chelonae / abscessus*, *Mycobacterium abscessus / immunogenum* y *M. chelonae* grupo III, dada la elevada similitud genética que presenta *M. abscessus* con *M. chelonae* y *M. immunogenum*. De hecho, algunos sistemas comerciales no son capaces de diferenciar entre estas tres especies.

Como puede observarse en la tabla 2, la mayoría de los laboratorios (83, el 90,2%) identificaron correctamente la especie *M. abscessus*. Otros 3 laboratorios (3,2%) informaron *M. abscessus / immunogenum*, 2 (2,2%) *M. chelonae / abscessus*, y otros 2 respondieron *M. chelonae* grupo III. Así, el porcentaje de respuestas aceptables alcanzó el 97,8%.

Tabla 2. Resultados de la identificación micobacteriana.

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium abscessus</i>	83	90,2
<i>Mycobacterium abscessus / immunogenum</i>	3	3,2
<i>Mycobacterium chelonae / abscessus</i>	2	2,2
<i>Mycobacterium chelonae</i> grupo III	2	2,2
Micobacteria no cromógena de crecimiento rápido	1	1,1
<i>Mycobacterium</i> (no <i>M. tuberculosis</i>)	1	1,1
Total	92	100,0

MÉTODOS Y MARCAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN

En cuanto a los métodos utilizados para la identificación, de los 92 centros que enviaron la hoja de respuesta con datos analizables, 4 (4,3%) no aportaron información al respecto, recurriendo tres de ellos a un laboratorio externo de referencia.

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 otro método (inmunocromatografía, PCR a tiempo real, espectrometría de masas, pruebas bioquímicas, características morfo-culturales o PCR-RFLP) por 52 participantes (56,5%). En segundo lugar, destaca la espectrometría de masas, que fue empleada por 33 laboratorios (35,9%). Respecto a la secuenciación, fue requerida por 8 centros (8,7%). En este control, las pruebas bioquímicas clásicas sólo fueron informadas por 7 participantes (7,6%), en todos los casos junto a algún método molecular. El conjunto de los métodos empleados queda reflejado en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados en la identificación.

Método	Número	%
Hibridación inversa	26	28,3
Espectrometría de masas	23	25,0
Hibridación inversa + inmunocromatografía	8	8,7
Hibridación inversa + PCR a tiempo real	7	7,6
Hibridación inversa + espectrometría de masas	5	5,4
Espectrometría de masas + secuenciación	4	4,3
Hibridación inversa + pruebas bioquímicas	4	4,3
Oligocromatografía	2	2,2
Pruebas bioquímicas + secuenciación	2	2,2
Espectrometría de masas + sonda	1	1,1
Hibridación inversa + características morfo-culturales	1	1,1
Hibridación inversa + PCR-RFLP	1	1,1
Inmunocromatografía	1	1,1
Pruebas bioquímicas + sonda	1	1,1
Secuenciación	1	1,1
Secuenciación + características morfo-culturales	1	1,1
No informa	4	4,3
Total	92	100,0

^aPCR: 17QALReacción en cadena de la polimerasa; RFLP: *restriction fragment length polymorphism*.

En cuanto a las marcas comerciales empleadas, hubo un predominio de las tiras de hibridación inversa de GenoType *Mycobacterium* CM de Hain Lifescience (el 52,4% respecto al conjunto de las técnicas de identificación comerciales empleadas), seguido del MALDI-TOF de Bruker (28,6%) y del INNO-LiPA de Fujirebio (8,3%). Todos estos sistemas comerciales obtuvieron un excelente índice de aciertos para la identificación de la especie *M. abscessus* con la única excepción del INNO-LiPA® de Fujirebio, que solamente alcanzó el 42,8% de identificaciones correctas. Ello se debe a que el INNO-LiPA® detecta el complejo *Mycobacterium chelonae*, sin ser capaz de discriminar entre las especies *M. chelonae*, *M. abscessus* y *M. immunogenum*. La totalidad de las marcas empleadas se muestra en la tabla 4, mientras que la capacidad de los tres sistemas comerciales mayoritarios para identificar la cepa se resume en la tabla 5.

Tabla 4. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Método comercial	Número	% uso	% acierto
GenoType <i>Mycobacterium</i> CM (Hain)	44	52,4	93,2
MALDI-TOF (Bruker)	24	28,6	100,0
INNO-LiPA® (Fujirebio)	7	8,3	42,8
MALDI-TOF (VITEK® MS)	3	3,6	100,0
Speed-oligo® <i>Mycobacteria</i> (Vircell)	3	3,6	100,0
GenoType NTM-DR (Hain)	2	2,4	100,0
BD MGIT™ TBc (Becton Dickinson)	1	1,1	0,0
Total	84	100,0	90,5

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

Sistema	Número	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> / <i>immunogenum</i>	<i>M. chelonae</i> grupo III	<i>M. chelonae</i> / <i>abscessus</i>
GenoType <i>Mycobacterium</i> CM	44	41 (93,2)	3 (6,8)	0	0
MALDI-TOF (Bruker)	24	24 (100,0)	0	0	0
INNO-LiPA® (Fujirebio)	7	3 (42,8)	0	2 (28,6)	2 (28,6)
MALDI-TOF (VITEK® MS)	3	3 (100,0)	0	0	0
Speed-oligo® <i>Mycobacteria</i>	3	3 (100,0)	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 90 centros que realizaron una identificación de *M. abscessus* o de su complejo. De ellos 39 no realizaron el estudio de sensibilidad, por lo que se analizaron un total de 51 antibiogramas.

La técnica empleada de forma mayoritaria fue la microdilución, informada por 26 centros (51,0% de las respuestas con antibiograma). A continuación, le siguen las tiras de gradiente de concentración, utilizadas por 20 centros (el 39,2%). La totalidad de los métodos empleados se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Métodos empleados en el antibiograma.

Método	Número	%
Microdilución	24	47,1
Tira de gradientes de concentración	18	35,2
Dilución en medio líquido + microdilución	2	3,9
Disco-placa + tiras de gradientes de concentración	1	2,0
Proporciones + tiras de gradientes de concentración	1	2,0
No informa	5	9,8
Total	51	100,0

En cuanto a los equipos comerciales empleados para la obtención de la CMI destaca, en primer lugar, el panel de microdilución de Sensititre®, que fue usado por 24 centros (47,1%). A continuación, le siguen las tiras de E-test® de bioMérieux (15 centros, 29,4%), mientras que las tiras de gradiente de concentración de Oxoid fueron informadas por 2 centros (3,9%), y las de MIC Test Strip de Liofilchem® por 1 centro (1,9%). Hubo 9 participantes (17,7%) que no aportaron información acerca de la marca comercial. 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)	24	47,1
E-test® (bioMérieux)	15	29,4
Oxoid (tiras de gradiente de concentración)	2	3,9
MIC Test Strip (Liofilchem®)	1	1,9
No informa	9	17,7
Total	51	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 51 laboratorios que realizaron el antibiograma, 39 (76,5%) emplearon los criterios del CLSI, otros 10 (19,6%) los publicados en la bibliografía, y otros 2 centros (3,9%) informaron según los criterios del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 8.

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

Criterio	Número	%
CLSI	39	76,5
EUCAST	2	3,9
Bibliografía	10	19,6
Total	51	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 32 antibióticos diferentes.

Tabla 9. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos

Antibiótico	Nº	Categorización ^a			
		Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta
Amikacina	48	47 (97,9)	0	1 (2,1)	0
Amoxicilina-clavulanato	10	0	0	10 (100,0)	0
Cefoxitina	37	1 (2,7)	17 (45,9)	19 (51,4)	0
Ciprofloxacino	40	2 (5,0)	3 (7,5)	35 (87,5)	0
Claritromicina	48	35 (72,9)	1 (2,1)	12 (25,0)	0
Cotrimoxazol	33	1 (3,0)	0	32 (97,0)	0
Doxiciclina	35	0	1 (2,8)	34 (97,2)	0
Imipenem	42	3 (7,1)	6 (14,3)	33 (78,6)	0
Linezolid	38	17 (44,7)	10 (26,3)	11 (29,0)	0
Minociclina	12	0	0	12 (100,0)	0
Moxifloxacino	23	0	6 (26,1)	17 (73,9)	0

Tigeciclina	16	12 (75,0)	1 (6,2)	3 (18,8)	0
Tobramicina	17	6 (35,3)	7 (41,2)	4 (23,5)	0

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

Como se puede observar en esta tabla, existe una excelente concordancia entre los laboratorios participantes y el valor asignado para todos los antituberculosos estudiados con la excepción de la claritromicina. Ello se debe, como ya se ha comentado, a que la cepa era sensible a la claritromicina a los 3 días de incubación, si bien poseía una mutación en el gen *erm(41)*, que le confiere resistencia inducible a los macrólidos.

UTILIZACIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO.

De los 92 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 80 (87,0%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, otros 5 (5,4%) indicaron que sí lo habían empleado, y otros 7 (7,6%) lo usaron parcialmente.

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

Catorce centros comentaron que la cepa poseía el gen *erm(41)* con una mutación, con lo que presentaba una resistencia inducible a la claritromicina. Doce participantes especificaron la subespecie de la cepa enviada, que se trataba de un *M. abscessus* subsp. *abscessus*.

Por último, tres centros comentaron que el antibiograma no estaba estandarizado en esta especie. Asimismo, dos participantes especificaron que convendría enviar la cepa a un laboratorio externo de referencia para el estudio de sensibilidad.

Madrid, 10 de noviembre de 2017



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. Si en un determinado momento se necesita subcontratar otras

actividades diferentes a las indicadas se informará debidamente. Las actividades subcontratadas que afectan al valor asignado y a los estudios de homogeneidad son realizadas por colaboradores externos que cumplen con los requerimientos de la norma ISO 17043 y/o por laboratorios expertos seleccionados que han sido evaluados previamente por el Programa CCS. En caso de subcontratación de laboratorios externos, todos los análisis se realizarán bajo 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.