

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL MB-3/19

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 mujer de 65 años, no fumadora, que presentó dos episodios de hemoptisis leve, por lo que fue remitida al servicio de Neumología. La paciente, con antecedentes de infección respiratoria, había presentado en las últimas semanas un cuadro de tos persistente y sensación de disnea junto a febrícula vespertina sin dolor torácico asociado. En la exploración física presentaba una saturación basal de oxígeno del 96%, se auscultaban crepitantes pulmonares en base izquierda, mientras que en la radiografía de tórax se evidenciaba un área de bronquiectasias quísticas posterobasal izquierda y una pequeña zona de condensación basal subpleural adyacente. Se le realizó una fibrobroncoscopia en la que se obtuvieron secreciones mucosas purulentas. El líquido broncoalveolar se remitió para citología y no se observaron signos de malignidad; parte de este era remitido al Servicio de Microbiología para estudio bacteriológico y de micobacterias. A los 10 días de incubación, el cultivo de la muestra en medio líquido de micobacterias fue positivo, creciendo la cepa objeto del presente 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 abscessus* (actualmente denominada *Mycobacteroides abscessus*). 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. El consenso de expertos usó para la interpretación de los resultados los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) del documento M24-A2 correspondientes a las micobacterias de crecimiento rápido.

Tabla 1. Estudio de sensibilidad de consenso de expertos

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Categorización ^a
		CLSI (M24-A2-2011)
Amikacina	4	S
Cefoxitina	128	R
Ciprofloxacino	>4	R
Claritromicina	8	R
Cotrimoxazol	>152/8	R
Doxiciclina	>16	R
Imipenem	>64	R
Minociclina	>8	R

^aS: sensible; R: resistente.

La CMI de la claritromicina fue de 0,125 µg/mL (sensible) a los 3 días incubación, frente a una CMI de 8 µg/mL (resistente) en 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 92 remitieron hojas de respuesta con resultados valorables, lo que supone un porcentaje de participación real del 91,1%. Este porcentaje es similar al del último control de micobacterias, en el que se envió una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* (92,1%) e idéntico al del control MB-1/17, en el que también se remitió una cepa de *M. abscessus* (91,1%).

IDENTIFICACIÓN

El Programa de Control de Calidad SEIMC aceptó como óptima la identificación de especie *M. abscessus*, aunque dada la similitud genética también se aceptó válida la identificación de *M. abscessus / immunogenum*, y complejo *M. chelonae*, dado que 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 5 laboratorios (5,4%) informaron *M. abscessus / immunogenum*, y 2 (2,2%) complejo *M. chelonae*. Así, el porcentaje de respuestas aceptables alcanzó el 97,8%.

Tabla 2. Resultados de la identificación micobacteriana.

Identificación	Número	%
<i>M. abscessus</i>	83	90,2
<i>M. abscessus / immunogenum</i>	5	5,4
<i>M. chelonae complex</i>	2	2,2
Género <i>Mycobacterium</i>	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, 3 (3,2%) no aportaron información al respecto, recurriendo todos ellos a un laboratorio externo de referencia.

Respecto a las técnicas empleadas por los participantes, destaca en primer lugar las pruebas de hibridación inversa, que se usaron, bien en solitario o bien combinadas con otro método (espectrometría de masas, PCR a tiempo real, sondas moleculares, inmunocromatografía, PCR-RFLP, pruebas bioquímicas o características morfo-culturales) por 52 participantes (56,5%). En segundo lugar, destaca la espectrometría de masas, que fue empleada por 39 laboratorios (42,4%). Otros métodos informados fueron la PCR a tiempo real (11 centros, 12,0%), las sondas moleculares (7 centros, 7,6%), la secuenciación (6 centros, 6,5%), la oligocromatografía (2 centros, 2,2%), las pruebas bioquímicas (2 centros, 2,2%) y la PCR-RFLP (2 centros, 2,2%). 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	27	29,4
Hibridación inversa	21	22,8

Hibridación inversa + espectrometría de masas	9	9,8
Hibridación inversa + PCR a tiempo real	7	7,6
Sonda + hibridación inversa	5	5,5
Espectrometría de masas + secuenciación	3	3,2
Hibridación inversa + inmunocromatografía	3	3,2
Secuenciación	3	3,2
Hibridación inversa + PCR-RFLP	2	2,2
Oligocromatografía	2	2,2
PCR a tiempo real	2	2,2
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa	2	2,2
Sonda + hibridación inversa + PCR a tiempo real	2	2,2
Hibridación inversa + características morfo-culturales	1	1,1
No informa	3	3,2
Total	92	100,0

Abreviaturas: PCR (reacción 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 GenoType *Mycobacterium* CM de Hain Lifescience (el 41,9% respecto al conjunto de las técnicas de identificación comerciales empleadas), seguido del MALDI-TOF de Bruker (30,2%), y de las tiras GenoType NTM-DR de Hain Lifescience (11,6%). Todos estos sistemas comerciales obtuvieron un índice de aciertos del 100% para la identificación de la especie a excepción de GenoType *Mycobacterium* CM y de las tiras de INNO-LiPA®. Ello se debe a que el GenoType *Mycobacterium* CM detecta el complejo *M. abscessus* sin ser capaz de diferenciarlo de la especie *M. immunogenum*. Respecto al INNO-LiPA®, detecta el complejo *M. 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 cinco sistemas comerciales empleados 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)	36	41,9	86,1
MALDI-TOF (Bruker)	26	30,2	100,0
GenoType NTM-DR (Hain)	10	11,6	100,0
MALDI-TOF (VITEK® MS)	4	4,7	100,0
INNO-LiPA® (Fujirebio)	2	2,3	0,0

Speed-oligo® Mycobacteria (Vircell)	2	2,3	100,0
Xpert® (Cepheid) ^a	2	2,3	0,0
GenoType MTBC (Hain) ^a	1	1,2	100,0
GenoType Mycobacterium (Hain) ^b	1	1,2	100,0
No informa ^c	2	2,3	100,0
Total	86	100,0	89,5

^aEstos equipos no permiten la detección de *M. abscessus*.

^bNo especifican el equipo de GenoType utilizado.

^cMétodos empleados: espectrometría de masas (1), hibridación inversa (1).

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

Sistema	Número	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i> / <i>immunogenum</i>	Complejo <i>M. chelonae</i>
GenoType Mycobacterium CM (Hain)	36	31 (86,1)	5 (13,9)	0
MALDI-TOF (Bruker)	26	26 (100,0)	0	0
GenoType NTM-DR (Hain)	10	10 (100,0)	0	0
MALDI-TOF (VITEK® MS)	4	4 (100,0)	0	0
INNO-LiPA® (Fujirebio)	2	0	0	2 (100,0)

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 35 no realizaron el estudio de sensibilidad, por lo que se analiza un total de 55 antibiogramas.

La técnica mayoritaria fue la microdilución, empleada por 33 centros (60,0% de las respuestas con antibiograma). A continuación, le siguen las tiras de gradiente de concentración, utilizadas por 16 centros (29,1%). La totalidad de los métodos empleados se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Métodos empleados en el antibiograma.

Método	Número	%
Microdilución	29	52,7
Tiras de gradientes de concentración	14	25,5
Dilución en medio líquido + microdilución	2	3,6
Disco-placa + tiras de gradientes de concentración	1	1,8

Microdilución + disco-difusión	1	1,8
Microdilución + tira de gradientes de concentración + disco-placa	1	1,8
No informa	7	12,7
Total	55	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 informado por 31 centros (56,4%). A continuación, le siguen las tiras de E-test® de bioMérieux (13 centros, 23,6%), mientras que las tiras de gradiente de concentración de MIC Test Strip de Liofilchem® fueron usadas por 2 centros (3,6%). Hubo 9 participantes (16,4%) que no aportaron información acerca de la marca comercial. El conjunto de las marcas empleadas se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Marcas empleadas en el antibiograma.

Marca	Número	%
Sensititre™ (Thermo Scientific)	31	56,4
E-test® (bioMérieux)	13	23,6
MIC Test Strip (Liofilchem®)	2	3,6
No informa ^a	9	16,4
Total	55	100,0

^aMétodos: microdilución (2, uno junto con tiras de gradiente de concentración), 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 55 laboratorios que lo realizaron, 40 (72,8%) emplearon los criterios del CLSI, 8 (14,5%) los publicados en la bibliografía, y los 7 centros restantes (12,7%) informaron que habían interpretado las CMIs obtenidas 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	40	72,8
EUCAST	7	12,7
Bibliografía	8	14,5
Total	55	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, pero tan solo 13 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	53	52 (98,1)	0	1 (1,9)	0	0
Amoxic.-clavulanato	14	0	0	13 (92,9)	1 (7,1)	0
Cefoxitina	38	5 (13,2)	13 (34,2)	20 (52,6)	0	0
Ciprofloxacino	39	2 (5,1)	6 (15,4)	31 (79,5)	0	0
Claritromicina	53	29 (54,7)	1 (1,9)	23 (43,4)	0	0
Cotrimoxazol	33	7 (21,2)	0	26 (78,8)	0	0
Doxiciclina	40	0	0	40 (100,0)	0	0
Imipenem	36	7 (19,4)	7 (19,4)	22 (61,2)	0	0
Linezolid	40	19 (47,5)	10 (25,0)	11 (27,5)	0	0
Minociclina	15	0	1 (6,7)	14 (93,3)	0	0
Moxifloxacino	33	4 (12,1)	5 (15,2)	24 (72,7)	0	0
Tigeciclina	12	7 (58,3)	3 (25,0)	0	2 (16,7)	0
Tobramicina	22	16 (72,8)	3 (13,6)	3 (13,6)	0	0

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

Como se puede observar en esta tabla, existe una alta concordancia entre los laboratorios participantes y el valor asignado para la amikacina, doxiciclina y minociclina. Sin embargo, la concordancia para el resto de antibióticos ha sido menor. La discordancia observada con la claritromicina 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 con resultados analizables, 79 (85,9%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 5 (5,4%) indicaron que sí lo habían empleado y los 8 restantes (8,7%) lo usaron parcialmente.

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

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

Fueron cuatro los centros que realizaron recomendaciones terapéuticas, principalmente el tratamiento con la asociación de claritromicina, amikacina y cefoxitina, imipenem o tigeciclina, hasta la obtención del resultado del antibiograma.

Un centro comentó que obtuvo un cultivo contaminado, por lo que la respuesta que remitió no fue valorable.

Por último, dos laboratorios comentaron que, de tratarse de una muestra clínica, habrían remitido la cepa a su centro de referencia para antibiograma; mientras que seis laboratorios señalaron que el antibiograma informado se había enviado a su centro de referencia.

Madrid, 21 de enero de 2020



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.