

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL MB-3/20

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 a partir de una paciente de 33 años ex usuaria a drogas por vía parenteral que acudía a consultas externas de Enfermedades Infecciosas de su hospital por presentar, desde hacía casi un mes, un cuadro de malestar general acompañado de febrícula, astenia y anorexia. Era una paciente diagnosticada desde hacía 10 años de infección por VIH estadio C3, con mala adherencia al tratamiento antirretroviral; con antecedentes de candidiasis esofágica, herpes mucocutáneo y tuberculosis extrapulmonar correctamente tratada hacía 3 años. En la exploración física, presentaba signos de colestasis disociada; en la analítica se observaba una PCR de 180 mg/L, ASAT 30 U/L, ALAT 63 U/L, fosfatasa alcalina 234 U/L, GGT 397 U/L y unos linfocitos totales de 154 y 10 linfocitos CD4/mL. Se decidió su ingreso en planta y se remitieron dos frascos de hemocultivos, heces y orina para cultivo bacteriológico, resultando todos ellos negativos. Se inició tratamiento profiláctico con ciprofloxacino, aciclovir y trimetoprima-sulfametoxazol, y se realizó una ecografía de tórax y de la vía biliar sin ningún hallazgo destacable. Se le practicó, además, una biopsia hepática percutánea que reveló la existencia de granulomas no necrotizantes. Esta muestra, junto a una muestra de sangre, fue remitida al Servicio de Microbiología para cultivo de micobacterias. La baciloscopia de la biopsia mostró la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes, que crecieron a los 17 días en medio líquido y sólido, siendo esta micobacteria el objeto del control. El cultivo de la muestra de sangre también fue positivo a los 21 días de incubación.

MB-3/20

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 celatum*. Esta identificación de referencia se obtuvo mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) 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*) correspondientes a micobacterias no tuberculosas distintas de MAC y de *Mycobacterium. kansasii*.

Tabla 1. Estudio de sensibilidad de consenso de expertos

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Categorización ^a
		CLSI (M62-1st ed-2018)
Amikacina	≤1	S
Ciprofloxacino	1	S
Clarithromicina	0,25	S
Cotrimoxazol	0,5	S
Doxiciclina	>16	R
Estreptomicina	1	NI
Etambutol	4	NI
Etionamida	0,6	NI
Isoniacida	1	NI
Linezolida	4	S
Moxifloxacino	≤0,12	S
Rifabutina	4	R
Rifampicina	>8	R

^aS: sensible, R: resistente, NI: no interpretada.

PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 100 centros inscritos a este control, de los que respondieron 90, todos ellos con resultados valorables, por lo que el porcentaje de participación es del 90,0%. Este porcentaje es superior al del último control de Micobacteriología, en el que se envió una cepa de *M. kansasii* (85,0% de participación).

IDENTIFICACIÓN

El Programa de Control de Calidad SEIMC aceptó como respuesta válida únicamente la identificación correcta de género y especie (*M. celatum*). Como se puede observar en la tabla 2, la gran mayoría de los centros (85, el 94,5%) identificó correctamente la especie de la cepa remitida.

Tabla 2. Resultados de la identificación micobacteriana.

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium celatum</i>	85	94,5
Género <i>Mycobacterium</i>	3	3,3
<i>Mycobacterium</i> (no <i>M. tuberculosis</i>)	1	1,1
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1	1,1
Total	90	100,0

MÉTODOS Y MARCAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN

En cuanto a los métodos utilizados para la identificación, de los 90 centros que enviaron la hoja de respuesta, hubo 5 de ellos (5,5%) que no aportaron información al respecto, recurriendo todos ellos a un laboratorio externo.

En este control las dos técnicas mayoritariamente empleadas por los participantes, usadas en solitario o bien combinadas junto con otro método, fueron la espectrometría de masas y la hibridación inversa, empleadas cada una por 43 de los centros participantes (47,8%). Otros métodos informados fueron la secuenciación informada por 9 centros (9,0%), la PCR a tiempo real por 7 (7,8%), las pruebas bioquímicas por 2 (2,2%), las sondas moleculares por otros 2 (2,2%), la oligocromatografía por 1 centro (1,1%) y la PCR-RFLP por otro (1,1%). El conjunto de los métodos empleados para la identificación queda reflejado en la tabla 3.

MB-3/20

Tabla 3. Métodos utilizados en la identificación.

Método	Número	%
Espectrometría de masas	31	34,5
Hibridación inversa	23	25,6
Espectrometría de masas + hibridación inversa	7	7,8
Espectrometría de masas + secuenciación	4	4,5
Hibridación inversa + PCR ^a a tiempo real	4	4,5
Secuenciación	3	3,3
Hibridación inversa + características morfo-culturales	2	2,2
Hibridación inversa + inmunocromatografía	1	1,1
Hibridación inversa + PCR a tiempo real + espectrometría de masas	1	1,1
Hibridación inversa + PCR-RFLP ^a	1	1,1
Hibridación inversa + secuenciación	1	1,1
Oligocromatografía	1	1,1
PCR a tiempo real	1	1,1
Pruebas bioquímicas + características morfo-culturales	1	1,1
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa	1	1,1
Secuenciación + características morfo-culturales	1	1,1
Sonda + hibridación inversa	1	1,1
Sonda + hibridación inversa + PCR a tiempo real	1	1,1
No informa	5	5,5
Total	90	100,0

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

En cuanto a las marcas comerciales empleadas, hubo un predominio del MALDI-TOF de Bruker (37,5%, respecto al conjunto de las técnicas de identificación comerciales empleadas) junto con las tiras de hibridación inversa GenoType Mycobacterium AS de Hain Lifescience (33,8%). El conjunto de las marcas informadas se muestra en la tabla 4. Hay que señalar que tanto las tiras GenoType MTBC como los cartuchos Xpert® detectan únicamente el complejo *M. tuberculosis*, mientras que las tiras GenoType Mycobacterium CM no son capaces de detectar la especie *M. celatum*.

Todos los sistemas comerciales que son capaces de detectar *M. celatum* obtuvieron un excelente índice de aciertos para la identificación de esta especie. El único resultado discrepante (*Mycobacterium smegmatis*) se produjo con el kit GenoType Mycobacterium AS (con una banda de diferencia entre ambas especies).

MB-3/20

Tabla 4. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Método comercial	Número	% uso	% acierto
MALDI-TOF (Bruker)	30	37,5	100,0
GenoType Mycobacterium AS (Hain)	27	33,8	96,3
GenoType Mycobacterium CM (Hain) ^a	8	10,0	62,5
MALDI-TOF (VITEK® MS)	7	8,8	100,0
INNO-LiPA® (Fujirebio)	4	5,0	100,0
GenoType MTBC (Hain) ^a	2	2,5	100,0
Speed-oligo® Mycobacteria (Vircell)	1	1,2	100,0
Xpert® (Cepheid) ^a	1	1,2	0,0
Total	80	100,0	93,8

^aEstos kits no permiten la detección de *M. celatum*.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a los 85 centros que informaron *M. celatum*. De ellos, 46 no realizaron el estudio fenotípico de sensibilidad, con lo que se analizaron un total de 39 antibiogramas.

Las dos técnicas mayoritarias fueron la microdilución (18 centros, el 46,2% de los centros con antibiograma), seguida de las tiras de gradiente de concentración (30,8%). La totalidad de los métodos empleados se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Métodos empleados en el antibiograma.

Método	Número	%
Microdilución	17	43,5
Tiras de gradientes de concentración	9	23,1
Dilución en medio líquido / proporciones	3	7,7
Disco-placa + tiras de gradientes de concentración	1	2,6
Proporciones + tiras de gradientes de concentración	1	2,6
Tira de gradientes de concentración + proporciones + microdilución	1	2,6
No informa	7	17,9

MB-3/20

Total	39	100,0
-------	----	-------

En cuanto a los equipos comerciales empleados para la obtención de la CMI, destacan el panel de microdilución de Sensititre™, usado por 16 centros (el 41,0% que realizaron antibiograma), seguido de las tiras de Etest® de bioMérieux (6 centros, el 15,4%). Hubo 11 participantes (28,2%) que no aportaron información acerca de la marca comercial, de los cuales 9 remitieron el antibiograma a un centro externo. El conjunto de las marcas empleadas para el estudio de sensibilidad se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Marcas empleadas en el antibiograma.

Marca	Número	%
Sensititre™ (Thermo Scientific)	16	41,0
Etest® (bioMérieux)	6	15,4
BACTEC™ MGIT™ (Becton Dickinson)	4	10,3
MIC Test Strip (Liofilchem®)	2	5,1
No informa ^a	11	28,2
Total	39	100,0

^aMétodos: tiras de gradiente de concentración (3), microdilución (1), no informado (7).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS DE LOS PARTICIPANTES

Respecto a los criterios de puntos de corte utilizados para la interpretación del antibiograma, de los 39 laboratorios que lo realizaron, 20 (51,3%) emplearon los criterios del CLSI, otros 9 (23,1%) informaron que habían seguido los criterios del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), y otros 9 (23,1%) según los publicados en la bibliografía. Por último, hubo 1 centro (2,5%) que envió el antibiograma a un centro externo y no informó de esta premisa. Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 7.

Tabla 7. Criterios seguidos para la interpretación de los resultados.

Criterio	Número	%
CLSI	20	51,3
EUCAST	9	23,1

MB-3/20

Bibliografía	9	23,1
No informan	1	2,5
Total	39	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 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 24 antibióticos diferentes, de los cuales 14 fueron informados por 10 o más participantes.

Tabla 8. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos

Antibiótico	Nº	Categorización ^a				
		Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta	Evidencia insuficiente
Amikacina	29	25 (86,2)	0	1 (3,4)	3 (10,4)	0
Ciprofloxacino	25	17 (68,0)	5 (20,0)	0	3 (12,0)	0
Claritromicina	37	34 (91,9)	0	0	3 (8,1)	0
Cotrimoxazol	15	12 (80,0)	1 (6,7)	0	2 (13,3)	0
Doxiciclina	13	1 (7,7)	0	9 (69,2)	3 (23,1)	0
Estreptomicina	24	12 (50,0)	0	7 (29,2)	5 (20,8)	0
Etambutol	30	25 (83,3)	0	1 (3,3)	4 (13,4)	0
Etionamida	19	14 (73,7)	0	1 (5,2)	4 (21,1)	0
Isoniacida	30	4 (13,3)	0	20 (66,7)	6 (20,0)	0
Linezolid	21	10 (47,6)	3 (14,3)	5 (23,8)	3 (14,3)	0
Moxifloxacino	23	20 (87,0)	0	0	3 (13,0)	0
Pirazinamida	10	1 (10,0)	0	9 (90,0)	0	0

MB-3/20

Rifabutina	16	8 (50,0)	0	5 (31,2)	3 (18,8)	0
Rifampicina	32	5 (15,6)	0	24 (75,0)	3 (9,4)	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, cotrimoxazol, claritromicina y el moxifloxacino. Sin embargo, la concordancia para el resto de antituberculosos del antibiograma de referencia ha sido menor, sin asociarse a ningún método o marca en concreto. Remarcar que la interpretación de los resultados aportados en el valor asignado está referido a la versión M62-1st ed-2018.

UTILIZACIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO.

De los 90 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa con resultados analizables, 75 (83,3%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 10 (11,1%) indicaron que sí lo habían empleado y los 5 restantes (5,6%) lo usaron parcialmente.

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

Cuatro centros realizaron recomendaciones terapéuticas, principalmente el tratamiento con la asociación de claritromicina, ciprofloxacino y etambutol.

Cuatro laboratorios señalaron que el antibiograma informado se había enviado a un centro externo, mientras que otros dos laboratorios comentaron que, de tratarse de una muestra clínica, habrían remitido la cepa a su centro de referencia para antibiograma.

Dos centros comentaron que no había puntos de corte específicos de *M. celatum*, mientras que otros dos centros especificaron que habían utilizado los puntos de corte de *M. kansasii*.

Por último, dos centros señalaron que no habían encontrado mutaciones de resistencia a macrólidos y a aminoglucósidos.

MB-3/20

Madrid, 22 de febrero de 2021



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-3/20