

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOLOGÍA CONTROL M-2/22

En el Análisis de Resultados del presente control se comentan los resultados obtenidos en el estudio micológico de la muestra enviada para control externo. Se trató de un tubo de Sabouraud sembrado con el hongo a estudio, que había sido preparado por el Programa de Control de Calidad Externo SEIMC (Programa CCS) a partir de una cepa de reserva, la cual 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 la muestra a través de ensayos realizados tras la siembra de tubos de Sabouraud y tras su envío, asegurando así la validez de la misma.

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 el presente control se envió a los participantes un tubo con medio Sabouraud que contenía un único hongo filamentosos. La historia clínica que acompañaba a la cepa correspondía a la de un paciente varón de 67 años que acudía al Servicio de Urgencias por presentar dolor intenso, edema palpebral y disminución de la agudeza visual del ojo derecho de hacía dos días de evolución. Refería haber tenido un episodio autolimitado de sensación de cuerpo extraño dos semanas antes. El paciente presentaba como antecedentes personales de interés hipertensión arterial y diabetes mellitus insulino-dependiente. Se decidió tomar muestra de exudado corneal y se envió al Servicio de Microbiología para estudio bacteriológico y micológico, aislándose el hongo que fue objeto de este control.

Se solicitó a los laboratorios participantes la **identificación** del hongo implicado en este cuadro clínico, el **estudio de sensibilidad** si procedía, así como que formularan los **comentarios** que consideraran oportunos.

VALOR ASIGNADO

La cepa fue identificada como *Fusarium solani* (valor asignado de referencia y empleado para el estudio comparativo). Esta identificación se realizó mediante cultivo y espectrometría de masas y fue confirmada por secuenciación del ARN ribosómico 18S.

M-2/22

PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a 199 laboratorios participantes, de los que 173 remitieron hoja de respuesta. Hubo doce centros que, tras la siembra del hongo, no obtuvieron crecimiento y no emitieron ninguna identificación; mientras que otro centro respondió “no informa”. Hubo un total de 160 respuestas analizables, lo que supone un porcentaje de participación real del 80,4%. Este porcentaje es inferior al del último control de Micología (94,0%, un cultivo de *Candida auris*) y también inferior al del control M-1/21 (89,7%, un cultivo de *Trichophyton mentagrophytes*). Desde el Programa de Control de Calidad se informó a los participantes de que en algunos casos la cepa remitida no crecía tras el subcultivo. Se recomendó que contactaran con la secretaria solicitando el envío de una nueva muestra y al mismo tiempo se amplió el plazo de respuesta. El hongo mantenía sus estructuras morfológicas, lo que permitía su reconocimiento e identificación por métodos clásicos, proteómicos y genómicos. El estudio de sensibilidad era opcional y si no había crecimiento no podía ser realizado.

IDENTIFICACIÓN

El Programa de Control de Calidad SEIMC aceptó como válida la identificación correcta de género y especie (*F.solani*), y como aceptables las identificaciones mínimas de género *Fusarium* o bien, la de otra especie perteneciente al mismo. Hubo un 55,0% de los participantes identificaron correctamente el género y la especie del hongo remitido, mientras que un 32,5% respondió género *Fusarium* y un 5,0% identificaron otra especie de dicho género. Así, el 92,5% de los participantes (148) encuadraron correctamente el hongo filamentoso remitido dentro del género *Fusarium*. El conjunto de todas las identificaciones informadas se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la identificación micológica.

Identificación	Número	%
<i>Fusarium solani</i>	88	55,0
Género <i>Fusarium</i>	52	32,5
<i>Fusarium oxysporum</i>	6	3,8
Género <i>Acremonium</i>	3	2,0
<i>Aspergillus niger</i>	2	1,3
<i>Acremonium strictum</i>	1	0,6
<i>Candida no albicans</i>	1	0,6
<i>Fusarium petroliphilum</i> (<i>F. solani</i> var. <i>petroliphilum</i>)	1	0,6
<i>Fusarium verticilloides</i>	1	0,6
Género <i>Beauveria</i>	1	0,6

Género <i>Geotrichum</i>	1	0,6
Género <i>Paecilomyces</i>	1	0,6
Género <i>Penicillium</i>	1	0,6
Género <i>Trichosporon</i>	1	0,6
Total	160	100,0

MÉTODOS Y MARCAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN

En cuanto a los métodos para la identificación, hubo una amplia variabilidad de técnicas informadas, aunque en su mayoría se basan en las características macroscópicas y microscópicas de la cepa, con tinción de azul de lactofenol. Respecto al resto de los métodos utilizados, hubo un 48,8% (78 centros) que utilizaron la espectrometría de masas y un 4,4% (7 centros) un estudio de secuenciación. La totalidad de los métodos informados se detalla en la tabla 2.

Tabla 2. Métodos utilizados en la identificación.

Método	Número	%
Espectrometría de masas	33	20,6
Espectrometría de masas + tinción con azul de lactofenol	20	12,5
Cultivo + estudio macro-microscópico con azul de lactofenol	17	10,6
Estudio macro-microscópico + espectrometría de masas	13	8,1
Cultivo + tinción con azul de lactofenol	11	6,9
Cultivo + estudio macro-microscópico	10	6,3
Estudio microscópico con azul de lactofenol	10	6,3
Estudio macro-microscópico con azul de lactofenol	9	5,6
Cultivo + microscopía	8	5,0
Espectrometría de masas + cultivo	7	4,3
Características morfológicas y culturales	3	1,8
Espectrometría de masas + secuenciación	3	1,8
Estudio macro-microscópico con azul de Cotton	3	1,8
Cultivo en Saboraud-Gentamicina-Cloranfenicol	2	1,3
Espectrometría de masas + cultivo + secuenciación	2	1,3

Estudio macroscópico y microscópico	2	1,3
Estudio microscópico con azul de toluidina	2	1,3
Microscopía + cultivo cromogénico	2	1,3
Secuenciación	2	1,3
Microscopía	1	0,6
Total	160	100,0

Para la identificación del hongo filamentoso, 78 de los 160 participantes (48,8%) recurrieron a un sistema comercial, en todos los casos basado en la espectrometría de masas. De estos 78 centros, 59 (75,6%) utilizaron el MALDI-TOF de Bruker y los otros 19 (24,4%) el MALDI-TOF de VITEK® MS. Estos datos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Método comercial	Número	% uso	% acierto
MALDI-TOF(Bruker)	59	75,6	89,8
MALDI-TOF(VITEK® MS)	19	24,4	100,0
Total	78	100,0	92,3

La capacidad de estos dos sistemas comerciales para identificar la cepa se resume en la tabla 4. En cuanto al MALDI-TOF VITEK® MS, todos los centros que lo utilizaron respondieron correctamente la especie del hongo remitido. Sin embargo, respecto al MALDI-TOF de Bruker, hubo 6 resultados (10,2%) que fueron discrepantes, de los cuales solo tres estaban encuadrados dentro del género *Fusarium*. Por otra parte, de los 7 centros que realizaron un estudio de secuenciación, seis identificaron el hongo como *F. solani* y un laboratorio respondió *Fusarium petroliphilum*, que se trata de una variante de *F. solani*.

Tabla 4. Resultados de identificación de *F. solani* con los sistemas comerciales más empleados.

Sistema	Número	<i>Fusarium solani</i>	Otras identificaciones ^a
MALDI-TOF(Bruker)	59	53 (89,8)	6 (10,2)
MALDI-TOF(VITEK® MS)	19	19 (100,0)	0

^aIdentificaciones informadas: *Aspergillus niger* (2), *Fusarium oxysporum* (1), *Fusarium petroliphilum* (1), género *Fusarium* (1) y género *Geotrichum* (1).

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIFUNGICOS

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a los 148 centros que realizaron una identificación mínima de género *Fusarium*. De ellos, 132 no realizaron el estudio de sensibilidad, por lo que se analizaron un total de 16 antifungigramas.

La tendencia mayoritaria fue determinar la CMI mediante las tiras de gradiente de concentración, que fueron utilizadas por 9 de los 16 centros (56,3%), seguidas por la microdilución, en 8 centros (50,0%). Estos datos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Métodos empleados en el antifungigrama.

Método	Número	%
Microdilución	6	37,5
Tiras de gradientes de concentración	6	37,5
Microdilución + tiras de gradiente de concentración	2	12,6
Disco-placa + tiras de gradientes de concentración	1	6,2
No informa	1	6,2
Total	16	100,0

Respecto a las marcas empleadas para obtener las CMIs, el sistema comercial más utilizado fue el panel Sensititre™ de ThermoScientific™ (43,8% de los centros que utilizaron un sistema comercial) seguido de las tiras de Etest® de bioMérieux (25,0%). El conjunto de las marcas empleadas en el antifungigrama se detalla en la tabla 6.

Tabla 6. Marcas empleadas en el antifungigrama.

Marca	Número	%
Sensititre™ (ThermoScientific™)	7	43,8
Etest® (bioMérieux)	4	25,0
MIC Test Strip (Liofilchem®)	2	12,5
No informa ^a	3	18,7
Total	16	100,0

^aMétodos: microdilución (1), tiras de gradiente de concentración (1), no informa (1).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS DE LOS PARTICIPANTES

Se solicitó a los participantes qué criterios de puntos de corte habían utilizado para la interpretación de su antifungigrama. Así, de los 16 laboratorios con la identificación mínima de género *Fusarium* que realizaron antifungigrama, 5 (31,3%) utilizaron los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), otros 3 (18,7%) utilizaron los de EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) y 2 (12,6%) emplearon criterios de ambos comités. Por último, hubo 2 laboratorios (12,6%) que se basaron en la bibliografía,

mientras que los 3 laboratorios restantes (18,7%) no aportaron información al respecto. Estos datos se muestran en la tabla 7.

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

Criterio	Número	%
CLSI	5	31,3
Bibliografía	3	18,7
EUCAST	3	18,7
CLSI + EUCAST	2	12,6
No informan	3	18,7
Total	16	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 obtenidos para algún antifúngico que no se correspondiera con el patrón de resistencia intrínseca del microorganismo estudiado, 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 10 antifúngicos diferentes, de los cuales 6 se han informado por 10 o más participantes.

Tabla 9. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos.

Antibiótico	Nº	Categorización ^a				
		Sensible/SDE	Intermedio/SEI/SDD	Resistente	No interpreta	Evidencia insuficiente
Anfotericina B	16	2 (12,5)	0	3 (18,7)	11 (68,8)	0
Anidulafungina	10	0	0	4 (40,0)	6 (60,0)	0
Caspofungina	11	2 (18,2)	0	4 (36,3)	5 (45,5)	0
Itraconazol	12	0	0	6 (50,0)	6 (50,0)	0
Posaconazol	12	0	0	3 (25,0)	9 (75,0)	0

Voriconazol	16	1 (6,2)	0	5 (31,3)	10 (62,5)	0
-------------	----	---------	---	----------	-----------	---

^aLos números entre paréntesis indican porcentajes sobre el total de ensayos para cada antibiótico. Abreviaturas: SDE (Sensible dosis estándar), SEI (Sensible con exposición incrementada). SDD (Sensible dosis dependiente).

UTILIZACIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO

Por lo que respecta a la necesidad de utilizar un laboratorio externo para la identificación del hongo objeto del control, de los 160 centros que emitieron un resultado evaluable: 158 (98,8%) participantes comentaron no utilizarlo y los 2 restantes (1,2%) afirmaron el haberlo usado.

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

El comentario más frecuente se refería a que no habían obtenido el crecimiento de la cepa en los subcultivos (por 18 centros) o bien que este crecimiento había sido dificultoso (otros 2 centros).

Hubo 7 centros que comentaron que en el caso del género *Fusarium* el antifungigrama no estaba estandarizado y que tampoco existían puntos de corte descritos, ni para el CLSI ni para el EUCAST. Si bien, otro participante señaló que sí había puntos de corte epidemiológicos para algunos antifúngicos publicados en *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol 60. 2016 (Ana Espinel-Ingroff).

Seis centros especificaron explícitamente la identificación de la especie que habían obtenido con el MALDI-TOF. Cuatro centros comentaron que hubieran respondido *F. solani* complex, no creada en la aplicación, y otros tres centros que habrían respondido una especie de hongos que tampoco estaba creada.

Por último, tres centros realizaron recomendaciones terapéuticas, principalmente el tratamiento tópico con natamicina al 5% o anfotericina B. Dos de estos centros recomendaron asociar tratamiento sistémico con voriconazol.

Madrid, 9 de marzo de 2023



C/ Agustín de Betancourt, 13
Entreplanta - 28003 Madrid
NIF: G-78387057

M-2/22

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, y los estudios de homogeneidad y estabilidad de las muestras levaduriformes provenientes de cada uno de los lotes, siguiendo una estricta programación de tareas. 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.

M-2/22