

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL MB-2/19

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 un varón de 71 años, diagnosticado de EPOC moderado, que había sido remitido a Neumología por su médico de familia por presentar, desde hacía mes y medio, un cuadro de astenia, febrícula de predominio vespertino, tos escasamente productiva y aumento de su disnea habitual (a medianos esfuerzos). La clínica no había mejorado a pesar de diferentes tratamientos antibióticos. Como datos de interés, el paciente había iniciado desde hacía un año y medio un tratamiento con fármacos biológicos para una artritis recientemente diagnosticada. En el momento de la exploración presentaba febrícula de 37,1°C y crepitantes en campo pulmonar derecho a la auscultación. La radiografía de tórax mostraba una cavitación en lóbulo superior derecho. Se recogieron tres muestras de esputo que fueron remitidas al Servicio de Microbiología para cultivo bacteriológico y de micobacterias. La baciloscopia fue positiva en una de las tres muestras, aislándose a los diez días en medio de cultivo líquido, la micobacteria que fue 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 empleado para el estudio comparativo fue *Mycobacterium tuberculosis*. Esta identificación de referencia se obtuvo mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) e 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 dilución en medio líquido (concentración crítica) 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 al complejo *M. tuberculosis*.

Tabla 1. Estudio de sensibilidad de consenso de expertos

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Categorización ^a
		CLSI (M24-A2-2011)
Isoniacida	0,1	S
Rifampicina	1,0	S
Etambutol	5,0	S
Estreptomina	1,0	S
Pirazinamida	100	S

^aS: sensible.

PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 101 centros inscritos a este control, de los que respondieron 93, todos ellos con resultados valorables, por lo que el porcentaje de participación es del 92,1%. Este porcentaje es similar tanto al del último control de Micobacteriología, en el que se envió una cepa de *Mycobacterium marinum* (92,1% de participación), como también al del control MB-3/18, en el que también se remitió una cepa de *M. tuberculosis* (91,1% de participación).

IDENTIFICACIÓN

El Programa de Control de Calidad SEIMC aceptó como respuesta válida la identificación de género y especie (*M. tuberculosis*), así como las respuestas complejo *M. tuberculosis* y *M. tuberculosis* / *Mycobacterium canetti*, por la similitud existente entre las especies de micobacterias que componen este complejo.

Como puede observarse en la tabla 2, algo más de la mitad de los centros (50,5%) informaron el complejo *M. tuberculosis*, mientras que un 38,7% informó correctamente la especie *M. tuberculosis*, y un 7,5% respondió *M. tuberculosis* / *M. canetti*; por lo que el porcentaje de acierto total alcanzó el 96,8%.

Tabla 2. Resultados de la identificación micobacteriana.

Identificación	Número	%
Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	47	50,5

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	36	38,7
<i>M. tuberculosis</i> / <i>Mycobacterium canetti</i>	7	7,5
<i>Mycobacterium abscessus</i> / <i>immunogenum</i>	1	1,1
<i>Mycobacterium bovis</i>	1	1,1
<i>Mycobacterium marinum</i>	1	1,1
Total	93	100,0

MÉTODOS Y MARCAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN

En cuanto a los métodos utilizados para la identificación, de los 93 centros que enviaron la hoja de respuesta, hubo tres centros (3,3%) que no aportaron información al respecto, recurriendo dos de ellos a un laboratorio externo.

La técnica empleada mayoritariamente por los participantes fue la hibridación inversa, usada, bien en solitario o bien combinada con otro método (inmuncromatografía, PCR a tiempo real, sondas moleculares, características morfo-culturales, *spoligotyping*, o PCR-RFLP) por 43 de los centros (46,2%). A continuación, le siguen la espectrometría de masas (25 centros, el 26,9%), la PCR a tiempo real (19 participantes, el 20,4%), y la inmuncromatografía (11 participantes, el 11,8%). El conjunto de los métodos empleados se detalla en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados en la identificación.

Método	Número	%
Espectrometría de masas	21	22,6
Hibridación inversa	20	21,5
PCR a tiempo real	12	12,9
Hibridación inversa + inmuncromatografía	6	6,4
Hibridación inversa + PCR a tiempo real	6	6,4
Sonda + hibridación inversa	5	5,4
Hibridación inversa + características morfo-culturales	3	3,2
Inmuncromatografía	3	3,2
Oligocromatografía	3	3,2
Secuenciación	3	3,2
Espectrometría de masas + pruebas bioquímicas	1	1,1
Espectrometría de masas + bioquímica + PCR a tiempo real	1	1,1
Espectrometría de masas + secuenciación	1	1,1

Espectrometría de masas + sonda	1	1,1
Hibridación inversa + inmunocromatografía + <i>spoligotyping</i>	1	1,1
Hibridación inversa + PCR-RFLP ^a	1	1,1
Sonda	1	1,1
Sonda + hibridación inversa + inmunocromatografía	1	1,1
No informa	3	3,2
Total	93	100,0

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

En cuanto a las marcas comerciales, hubo un predominio de las tiras de hibridación inversa de GenoType Mycobacterium de Hain Lifescience, empleadas en su conjunto (agrupando los *kits* MTBC, Mycobacterium CM y MTBDR*plus*) por 40 centros (el 46,5% respecto al conjunto de las técnicas de identificación comerciales). A continuación, le sigue el MALDI-TOF de Bruker (informado por el 20,9% de los centros) y los dispositivos Xpert® de Cepheid (8,1%). Todos los sistemas comerciales utilizados obtuvieron un alto índice de aciertos para la identificación de la especie o del complejo *M. tuberculosis*, si bien se produjeron tres resultados discrepantes. De estas discrepancias, dos se obtuvieron con el GenoType Mycobacterium CM de Hain (*Mycobacterium abscessus* / *immunogenum* y *Mycobacterium marinum*), y la otra con el MALDI-TOF de Bruker (*Mycobacterium bovis*). La totalidad de las marcas empleadas se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Método comercial	Número	% uso	% acierto
GenoType MTBC (Hain)	23	26,8	100,0
MALDI-TOF (Bruker)	18	20,9	94,5
GenoType Mycobacterium CM (Hain)	8	9,3	75,0
Xpert® (Cepheid)	7	8,1	100,0
GenoType Mycobacterium (Hain) ^a	5	5,8	100,0
MALDI-TOF (VITEK® MS)	5	5,8	100,0
GenoType MTBDR <i>plus</i> (Hain)	4	4,7	100,0
Speed-oligo® Mycobacteria (Vircell)	3	3,5	100,0
Anyplex™ II MTB/MDR/XDR (Seegene)	2	2,3	100,0
BD MGIT™ TBc (Becton Dickinson)	2	2,3	100,0
INNO-LiPA® (Fujirebio)	2	2,3	100,0
SD BIOLINE (Alere, Abbott)	2	2,3	100,0
AccuProbe®	1	1,2	100,0

COBAS® TaqMan® MTB Test	1	1,2	100,0
TBCheck MPT64 (Hain)	1	1,2	100,0
No informa ^b	2	2,3	100,0
Total	86	100,0	96,5

^aNo especifican el *kit* de GenoType utilizado.

^bMétodos empleados: espectrometría de masas (1), PCR a tiempo real (1).

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a todos los 90 centros que realizaron la identificación de *M. tuberculosis* o de su complejo. De ellos, 17 no realizaron el estudio fenotípico de sensibilidad con lo que se analizaron un total de 73 antibiogramas.

La técnica más utilizada fue la dilución en medio líquido, informada por 71 centros (el 97,3% de las respuestas con antibiograma), empleándose como método único en el 96,1% de las ocasiones. A continuación, le siguen las tiras de gradiente de concentración, empleadas por 2 centros (el 2,7%), un 1,3% de forma única. Hubo 1 centro (1,3%) que no aportó información al respecto, el cual envió la cepa a un laboratorio externo. La totalidad de los métodos informados se detalla en la tabla 5.

Tabla 5. Métodos empleados en el antibiograma.

Método	Número	%
Dilución en medio líquido / concentración crítica / proporciones	70	96,1
Proporciones + tiras de gradiente de concentración	1	1,3
Tira de gradiente de concentración	1	1,3
No informa	1	1,3
Total	73	100,0

Respecto a los sistemas comerciales empleados, destaca el equipo automatizado BACTEC™ MGIT™ 960 de Becton Dickinson, que fue usado por el 87,3% de los participantes. Del resto, un 9,9% realizaron dilución en caldo con el sistema VersaTREK™ de Thermo Fisher Scientific, mientras que otro centro (1,4%) utilizó las tiras de gradiente de concentración E-test® de bioMérieux. El conjunto de las marcas empleadas en el estudio de sensibilidad se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Marcas empleadas en el antibiograma.

Marca	Número	%
BACTEC™ MGIT™ (Becton-Dickinson)	62	87,3
VersaTREK™ (Thermo Fisher Scientific)	7	9,9
E-test® (bioMérieux)	1	1,4
No informa ^a	1	1,4
Total	71	100,0

^a Métodos: proporciones (1).

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 73 laboratorios que lo realizaron, 45 (61,6%) emplearon los criterios del CLSI, otros 20 (27,4%) informaron según criterios del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), y los 8 restantes (11,0%) según los publicados en la bibliografía. Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 7

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

Criterio	Número	%
CLSI	45	61,6
EUCAST	20	27,4
Bibliografía	8	11,0
Total	73	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 12 antibióticos diferentes, pero tan sólo 5 fueron informados por 10 o más participantes. Como se puede observar en dicha tabla, existe una excelente concordancia entre los laboratorios participantes y el valor asignado frente a todos los antimicrobianos ensayados.

Tabla 8. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos

Antibiótico	Nº	Categorización ^a				
		Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta	Evidencia insuficiente
Isoniacida	72	70 (97,3)	0	2 (2,7)	0	0
Rifampicina	72	73 (100,0)	0	0	0	0
Etambutol	71	68 (95,8)	1 (1,4)	2 (2,8)	0	0
Estreptomina	72	72 (100,0)	0	0	0	0
Pirazinamida	63	60 (95,3)	0	3 (4,7)	0	0

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

UTILIZACIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO.

De los 93 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 87 (93,5%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 4 (4,3%) indicaron que sí lo habían empleado y otros 2 (2,2%) lo usaron parcialmente.

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

Diecisiete centros informaron que la detección, mediante inmunocromatografía, de la proteína MPT64, específica del complejo *M. tuberculosis*, había sido negativa.

Tres centros indicaron que no detectaron ninguna mutación de resistencia mediante la hibridación inversa, utilizando el *kit* GenoType MTBDRplus (Hain). Dos centros recomendaron tratamiento antituberculoso durante 6-8 meses.

Por último, tres laboratorios comentaron que, de tratarse de una muestra clínica, habrían remitido la cepa a su centro de referencia para antibiograma, mientras que otro laboratorio señaló que el antibiograma informado se había enviado a su centro de referencia.

Madrid, 20 de noviembre de 2019




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.