

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL MB-2/21

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-Jenseny 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 de un paciente de 47 años y de nacionalidad ucraniana. El paciente residía en nuestro país desde hacía un año, y acudió a consulta de su MAP por presentar desde hacía un mes y medio, un cuadro de malestar general, astenia, anorexia, sensación febril no termometrada de predominio vespertino y ligera pérdida de peso. En la última semana, describía accesos de tos escasamente productiva, que en una ocasión había sido hemoptoica. En la exploración, se auscultaban crepitantes en ambos campos pulmonares de predominio en base derecha y en la radiografía de tórax se observaban ligeros infiltrados intersticiales bilaterales con una cavitación en lóbulo superior derecho. Se recogieron tres muestras de esputo que fueron remitidas al Servicio de Microbiología para estudio bacteriológico y de micobacterias. Se realizó interconsulta al Servicio de Neumología para el manejo del paciente. Desde el Servicio de Microbiología, se informaron dos baciloscopias positivas de las tres muestras enviadas y a los 10 días de incubación, los cultivos de las muestras en medio líquido de micobacterias resultaron positivos, creciendo la micobacteria que fue 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.

MB-2/21

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. Para la interpretación de los resultados se emplearon sólo los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) correspondientes al complejo *M. tuberculosis*, ya que no se dispone de criterios EUCAST para la interpretación de los antituberculosos de primera línea empleados en infecciones producidas por esta micobacteria.

Tabla 1. Estudio de sensibilidad de consenso de expertos

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Categorización ^a
		CLSI (M62-1st ed-2018)
Isoniacida	≤0,1	S
Rifampicina	≤1	S
Pirazinamida	≤100	S
Etambutol	>5	R ^b
Estreptomina	≤1	S

^aS: sensible, R: resistente. ^bNota: La cepa remitida presenta la mutación Met306Val en el gen *embB* con posición genómica 4247429, que determina una resistencia de bajo nivel al etambutol. Esto explica que puedan existir discrepancias de interpretación fenotípica entre laboratorios en los casos en que como éste no hay mutaciones asociadas. Es por ello que el Programa de Control de Calidad SEIMC ha decidido considerar también aceptables las respuestas que informaron la cepa como "sensible" al etambutol.

PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 99 centros inscritos a este control, de los que respondieron 88, todos ellos con resultados valorables, por lo que el porcentaje de participación es del 88,9%. Este porcentaje es ligeramente inferior tanto al del último control de Micobacteriología, en el que se envió una cepa de *Mycobacterium peregrinum* (92,9% de participación), como también al del control MB-1/20, en el que también se remitió una cepa de *M. tuberculosis* (93,0% de participación).

MB-2/21

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 canettii*, por la cercanía genética existente entre ambas las especies.

Como puede observarse en la tabla 2, más de la mitad de los centros (el 59,1%) informaron el complejo *M. tuberculosis*, mientras que un 37,5% informó correctamente la especie *M. tuberculosis* y un 3,4% respondieron *M. tuberculosis* / *M. canettii*; por lo que el porcentaje de acierto total alcanzó al 100,0% de los participantes.

Tabla 2. Resultados de la identificación micobacteriana.

Identificación	Número	%
Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	52	59,1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	33	37,5
<i>M. tuberculosis</i> / <i>Mycobacterium canettii</i>	3	3,4
Total	88	100,0

MÉTODOS Y MARCAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN

La técnica empleada mayoritariamente fue la hibridación inversa, usada, bien en solitario o bien combinada con otro método (PCR a tiempo real, pruebas bioquímicas, espectrometría de masas, inmunocromatografía, sondas moleculares, PCR-RFLP o *spoligotyping*) por 34 de los centros (38,6%). A continuación, le siguen la inmunocromatografía (30 participantes, el 34,1%), la espectrometría de masas (19 centros, el 21,6%) y la PCR a tiempo real (18 participantes, el 20,5%). Hubo 2 de los 88 centros que enviaron la hoja de respuesta con datos analizables (2,3%) que no aportaron información al respecto, recurriendo ambos a un laboratorio externo. El conjunto de los métodos empleados se detalla en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados en la identificación.

Método	Número	%
Inmunocromatografía	16	18,2
Hibridación inversa	14	15,9
Espectrometría de masas	9	10,3
PCR ^a a tiempo real	9	10,3
Hibridación inversa + PCR a tiempo real	5	5,7

MB-2/21

Espectrometría de masas + inmunocromatografía	4	4,6
Bioquímica + hibridación inversa	3	3,4
Espectrometría de masas + hibridación inversa	3	3,4
Hibridación inversa + inmunocromatografía	3	3,4
PCR a tiempo real + inmunocromatografía	3	3,4
Bioquímica + características morfo-culturales	2	2,3
LiquidArray®	2	2,3
PCR	2	2,3
Sonda + hibridación inversa + inmunocromatografía	2	2,3
Bioquímica + hibridación inversa + PCR-RFLP ^a	1	1,1
Espectrometría de masas + bioquímica	1	1,1
Espectrometría de masas + inmunocromatografía + PCR a tiempo real	1	1,1
Espectrometría de masas + PCR a tiempo real	1	1,1
Hibridación inversa + inmunocromatografía + <i>spoligotyping</i>	1	1,1
Hibridación inversa + PCR-RFLP	1	1,1
Oligocromatografía	1	1,1
Secuenciación	1	1,1
Sonda + hibridación inversa	1	1,1
No informa	2	2,3
Total	88	100,0

^aPCR: 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 (actualmente Bruker), empleadas en su conjunto (agrupando los *kits* MTBC, Mycobacterium CM, MTBDR*plus* y AS) por 31 centros (el 38,3% respecto al conjunto de las técnicas de identificación comerciales). A continuación, le siguen el MALDI-TOF de Bruker (informado por el 17,3% de los centros) y los cartuchos Xpert® de Cepheid (13,6%). Todos estos sistemas comerciales obtuvieron un excelente índice de aciertos para la identificación de la especie o del complejo *M. tuberculosis*. 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, Bruker)	18	22,2	100,0

MB-2/21

MALDI-TOF (Bruker)	14	17,3	100,0
Xpert® (Cepheid)	11	13,6	100,0
BD MGIT™TBc (Becton Dickinson)	9	11,1	100,0
GenoType Mycobacterium CM (Hain, Bruker)	8	9,9	100,0
SD BIOLINE (Abbott)	6	7,4	100,0
GenoType MTBDR _{plus} (Hain, Bruker)	4	4,9	100,0
Anyplex™ II MTB/MDR/XDR (Seegene)	2	2,5	100,0
FluoroType® MTBDR (Hain, Bruker)	2	2,5	100,0
MALDI-TOF (VITEK® MS)	2	2,5	100,0
TBCheck MPT64 (Hain, Bruker)	2	2,5	100,0
Anyplex™ II MTB/XDR (Seegene)	1	1,2	100,0
GenoTypeMycobacterium AS ^a (Hain, Bruker)	1	1,2	100,0
Speed-oligo® Mycobacteria (Vircell)	1	1,2	100,0
Total	81	100,0	100,0

^a Este *kit* no permite la detección del complejo *M. tuberculosis*.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a los 88 centros que realizaron la identificación de *M. tuberculosis* o de su complejo. De ellos, 19 no realizaron el estudio fenotípico de sensibilidad con lo que se analizaron un total de 69 antibiogramas.

La técnica más utilizada fue la dilución en medio líquido, informada por 67 centros (el 97,1% de las respuestas con antibiograma), empleándose como método único en el 94,2% de las ocasiones. A continuación, le siguen las tiras de gradiente de concentración, empleadas por 3 centros (el 4,3%), en todos los casos combinadas con otro método. 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	65	94,2
Proporciones + tiras de gradientes de concentración	2	2,8
Microdilución + tira de gradientes de concentración + disco-placa	1	1,5
No informa	1	1,5
Total	69	100,0

MB-2/21

Respecto a los sistemas comerciales empleados, destaca el equipo automatizado BACTEC™ MGIT™ 960 de Becton-Dickinson, que fue usado por el 94,2% de los participantes. Del resto, un 4,3% realizaron dilución en caldo con el sistema VersaTREK™ de Thermo Fisher Scientific, mientras que un centro (1,5%) informó que había utilizado las tiras de gradiente de concentración de la marca MIC Test Strip de Liofilchem®. 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)	65	94,2
VersaTREK™ (Thermo Fisher Scientific)	3	4,3
MIC Test Strip (Liofilchem®)	1	1,5
Total	69	100,0

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS DE LOS PARTICIPANTES

Respecto a los criterios de puntos de corte utilizados para la interpretación del antibiograma, de los 69 laboratorios que lo realizaron, 44 (63,8%) emplearon los criterios del CLSI, mientras que 16 (23,2%) informaron haber seguido los criterios EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), y 7 (10,1%) criterios publicados en la bibliografía. Por último, hubo 2 centros (2,9%) que no informaron 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	44	63,8
EUCAST	16	23,2
Bibliografía	7	10,1
No informan	2	2,9
Total	69	100,0

Se solicitó a los participantes que categorizaran el valor obtenido tal cual en su antibiograma 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.

MB-2/21

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 18 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, con la única excepción del etambutol. Esto se explica por la presencia en esta cepa, como hemos comentado, de la mutación Met306Val en el gen *embB*, que confiere resistencia de bajo nivel al etambutol, razón por la cual, desde el Programa de Control de Calidad SEIMC se han considerado aceptables también las respuestas que informaron la cepa como “sensible” al etambutol.

Tabla 8. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos

Antibiótico	Nº	Categorización ^a				
		Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta	Evidencia insuficiente
Isoniacida	69	67 (97,1)	0	2 (2,9)	0	0
Rifampicina	67	67 (100,0)	0	0	0	0
Pirazinamida	61	58 (95,1)	0	3 (4,9)	0	0
Etambutol	63	28 (44,4)	0	34 (54,0)	1 (1,6)	0
Estreptomina	67	66 (98,5)	0	1 (1,5)	0	0

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

UTILIZACIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO.

De los 88 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 76 (86,4%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 6 (6,8%) indicaron que sí lo habían empleado y otros 6 (6,8%) lo usaron parcialmente.

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

Trece centros indicaron que no detectaron ninguna mutación de resistencia a la isoniacida, rifampicina y a las quinolonas, y fueron once los que indicaron que la cepa era resistente al etambutol, algunos de ellos señalando que la cepa presentaba la mutación M306V en el gen *embB*, que le confería resistencia de bajo nivel al etambutol.

MB-2/21

Hubo otros centros que especificaron que dicha cepa era resistente al etambutol a la concentración crítica de 5 µg/mL pero sensible a 7,5 µg/mL.

Dos centros recomendaron tratamiento antituberculoso durante 6-9 meses con isoniacida y rifampicina, añadiendo pirazinamida los dos primeros meses.

Por último, un laboratorio mencionó 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 la confirmación de la resistencia al etambutol.

Madrid, 28 de octubre de 2021



Controlcalidadseimc
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-2/21