

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL MB-2/17

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 de una mujer de 67 años, que acudía a la consulta de Neumología, remitida por su médico de familia, por presentar desde hacía casi tres meses, un cuadro de astenia, febrícula de predominio vespertino, tos escasamente productiva y ligera disnea a medianos esfuerzos. La sintomatología no había cedido a pesar de diferentes tratamientos antibióticos. Como antecedentes de interés, la paciente relataba que, en el año previo, en su trabajo había una compañera con la que coincidía a veces en el autobús, que le habían dicho que tenía “tuberculosis”, pero al no trabajar en su mismo pabellón, ella no se hizo ninguna prueba. En el momento de la exploración presentaba febrícula de 37,5°C, ligera taquipnea, y sibilancias en campo pulmonar derecho a la auscultación. La radiografía de tórax mostró una cavitación con infiltrado pericavitario 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 dos de las tres muestras, aislándose a los ocho 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 de Bruker) e hibridación inversa (GenoType MTBC de Hain Lifescience), y fue confirmada por secuenciación del ARN ribosómico 16S.

Los resultados de sensibilidad antibiótica para determinar el valor asignado fueron obtenidos por dilución en medio líquido con el sistema comercial BD BACTEC™ MGIT 960 Sire Kits y se muestran en la tabla 1. Se emplearon para la interpretación de los resultados los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) correspondientes al complejo *M. tuberculosis*.

Tabla 1. Estudio de sensibilidad de consenso de expertos

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Categorización ^a
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 fue del 92,1%. Este porcentaje es similar al del último control de Micobacteriología, en el que se envió una cepa de *Mycobacterium abscessus* (91,1% de participación) y también al del control MB-4/16, en el que se remitió una de *M. tuberculosis* (86,8%).

IDENTIFICACIÓN

El Programa de Control de Calidad SEIMC aceptó como respuesta válida la identificación de género y especie (*M. tuberculosis*), así como las de y como las de *M. tuberculosis* / *Mycobacterium canetti* y complejo *M. tuberculosis*.

Como puede observarse en la tabla 2, algo más de la mitad de los centros (55,9%) informó complejo *M. tuberculosis*, mientras que un 38,7% informó correctamente la especie *M. tuberculosis*, y un 5,4% informó *M. tuberculosis* / *M. canetti*, por lo que el porcentaje de acierto total alcanzó el 100,0%.

Tabla 2. Resultados de la identificación micobacteriana.

Identificación	Número	%
Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	52	55,9
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	36	38,7
<i>M. tuberculosis</i> / <i>Mycobacterium canetti</i>	5	5,4

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, 2 (2,1%) no aportaron información al respecto, recurriendo ambos a un laboratorio externo.

La técnica empleada con mayor frecuencia por los participantes fue la hibridación inversa, usada, bien en solitario o bien combinada con otro método (PCR a tiempo real, inmunocromatografía, sondas moleculares, características morfo-culturales, espectrometría de masas, PCR-RFLP, *spoligotyping*, o pruebas bioquímicas) por 49 de los centros (52,7%). A continuación, le siguen la PCR a tiempo real (25 participantes, el 26,9%) y la espectrometría de masas (24 participantes, el 25,8%). El conjunto de los métodos empleados se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados en la identificación.

Método	Número	%
Hibridación inversa	19	20,5
Espectrometría de masas	14	15,0
PCR a tiempo real	14	15,0
Hibridación inversa + PCR a tiempo real	7	7,5
Hibridación inversa + inmunocromatografía	5	5,4
Sonda + hibridación inversa	5	5,4
Sonda	4	4,3
Hibridación inversa + características morfo-culturales	3	3,3
Hibridación inversa + espectrometría de masas	3	3,3
Espectrometría de masas + pruebas bioquímicas + PCR a tiempo real	2	2,1
Espectrometría de masas + sonda	2	2,1
Hibridación inversa + PCR a tiempo real + espectrometría masas	2	2,1
Hibridación inversa + PCR-RFLP	2	2,1
Oligocromatografía	2	2,1
Hibridación inversa + espectrometría de masas + <i>spoligotyping</i>	1	1,1
Inmunocromatografía	1	1,1
Pruebas bioquímicas	1	1,1
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa	1	1,1
Pruebas bioquímicas + sonda	1	1,1

Secuenciación	1	1,1
Sonda + hibridación inversa + inmunocromatografía	1	1,1
No informa	4	2,1
Total	93	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, empleadas en su conjunto (agrupando los *kits* MTBC, CM y MTBDR*plus*) por 44 centros (el 51,2% respecto al conjunto de las técnicas de identificación comerciales). A continuación, le sigue el MALDI-TOF de Bruker (17,5%) y el GeneXpert® de Cepheid (11,6%). 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)	18	20,9	100,0
MALDI-TOF (Bruker)	15	17,5	100,0
GenoType (Hain, sin especificar)	11	12,8	100,0
GeneXpert® (Cepheid)	10	11,6	100,0
GenoType <i>Mycobacterium</i> CM (Hain)	8	9,3	100,0
GenoType MTBDR <i>plus</i> (Hain)	7	8,1	100,0
AccuProbe® (Hologic®)	6	7,0	100,0
MALDI-TOF (VITEK® MS)	4	4,6	100,0
INNO-LiPA® (Fujirebio)	3	3,5	100,0
Speed-oligo® <i>Mycobacteria</i> (Vircell)	3	3,5	100,0
BD MGIT™ TBc (Becton Dickinson)	1	1,2	100,0
Total	86	100,0	100,0

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a todos los 93 centros que realizaron la identificación de *M. tuberculosis* o de su complejo. De ellos 20 no realizaron el estudio fenotípico de sensibilidad, por lo que se analizaron un total de 73 antibiogramas.

La técnica más utilizada fue la dilución en medio líquido, informada por 67 centros (91,8% de las respuestas con antibiograma), empleándose como método único por el 90,4%. A continuación, le siguen las tiras de gradiente de concentración, empleadas por 4 centros (5,5%), en el 4,1% de las ocasiones de forma única. La totalidad de los métodos empleados se detalla en la tabla 5.

Tabla 5. Métodos empleados en el antibiograma.

Método	Número	%
Dilución en medio líquido / concentración crítica / proporciones	66	90,4
Tira de gradientes de concentración	3	4,1
Dilución en medio líquido + microdilución	1	1,4
Proporciones + tiras de gradientes de concentración	1	1,4
No informa	2	2,7
Total	73	100,0

Respecto a los equipos comerciales empleados, destaca el sistema automatizado BACTEC™ MGIT 960 de Becton Dickinson, que fue usado por el 80,8% de los participantes. Del resto, cinco (6,8%) realizaron dilución en caldo con el sistema VersaTREK™ de Thermo Fisher Scientific, y otros 3 (4,1%) utilizaron las tiras de gradiente de concentración E-test® de bioMérieux. Cuatro de los centros (5,5%) no aportaron información al respecto, de ellos tres enviaron la micobacteria a un centro externo para antibiograma. 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)	59	80,8
VersaTREK™ (Thermo Fisher Scientific)	5	6,8
E-test® (bioMérieux)	3	4,1
bioMérieux (método proporciones)	2	2,8
No informa	4	5,5
Total	73	100,0

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, 47 (64,4%) emplearon los criterios del CLSI, otros 10 (13,7%) informaron según criterios del

EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), y los 16 restantes (21,9%) 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	47	64,4
EUCAST	10	13,7
Bibliografía	16	21,9
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 13 antibióticos diferentes. 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
Estreptomina	71	70 (98,6)	0	1 (1,4)	0
Etambutol	71	70 (98,6)	0	1 (1,4)	0
Isoniacida	72	71 (98,6)	0	0	1 (1,4)
Pirazinamida	61	57 (93,5)	0	4 (6,5)	0
Rifampicina	72	72 (100,0)	0	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, 85 (91,4%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 3 (3,2%) indicaron que sí lo habían empleado y otros 5 (5,4%) lo usaron parcialmente.

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

Diecinueve centros informaron que la detección mediante inmunocromatografía del antígeno MPT64, específico de *M. tuberculosis*, había sido negativa. Nueve centros indicaron que no detectaron ninguna mutación de resistencia mediante la hibridación inversa, utilizando el *kit* GenoType MTBDRplus (Hain). Dos centros recomendaron tratamiento antituberculostático durante 6 meses.

Por último, cuatro 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, 14 de noviembre de 2017



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 el transporte de las muestras, el valor asignado (consenso de expertos), y los estudios de homogeneidad y estabilidad. Si en un determinado momento se necesita subcontratar otras actividades diferentes a las indicadas se informará debidamente. Las actividades subcontratadas que afectan al valor asignado y a los estudios de homogeneidad son realizadas por colaboradores externos que cumplen con los requerimientos de la norma ISO 17043 y/o por laboratorios expertos seleccionados que han sido evaluados previamente por el Programa CCS. En caso de subcontratación de laboratorios externos, todos los análisis se realizarán bajo 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.