

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL (MB-4/15)

En el Análisis de Resultados del presente control se analizan 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 expertos (externos) 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 los tubos de Löwenstein-Jensen 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, quienes emplearon métodos con sensibilidad y especificidad adecuadas para la identificación y el estudio de sensibilidad. 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 un paciente de 32 años de edad, que acudía a la consulta de Neumología, remitido por su médico de familia, por presentar desde hacía aproximadamente un mes y medio, un cuadro de astenia, tos escasamente productiva y febrícula vespertina. La sintomatología no había cedido a pesar de diferentes tratamientos antibióticos. Como antecedentes de interés, el paciente relataba que hacía unos meses había estado conviviendo con un amigo que le habían dicho que tenía "tuberculosis". Se realizó una prueba de detección de interferón gamma frente a antígenos específicos de *Mycobacterium tuberculosis* y una radiografía de tórax que mostraba un infiltrado en el lóbulo pulmonar derecho. Se recogieron tres muestras de esputo para estudio bacteriológico (sin aislamientos significativos) y de micobacterias. Aunque la baciloscopia directa resultó positiva solo en uno de ellos, a los 9 días de incubación en medio líquido, creció en las tres muestras la micobacteria que fue el 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.

VALOR ASIGNADO

El valor asignado de referencia empleado para el estudio comparativo fue *Mycobacterium tuberculosis*. Esta identificación se obtuvo mediante hibridación inversa (GenoType MTBC, Hain Lifescience) y fue confirmada por secuenciación del ARN ribosómico 16S.

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

Tabla 1. Valor asignado del estudio de sensibilidad.

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Categorización ^a
Isoniacida	≤0,1	S
Rifampicina	≤1,0	S
Pirazinamida	≤100	S
Etambutol	≤5,0	S
Estreptomina	≤1,0	S

^aS: sensible.

PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 106 centros inscritos a este control, de los que respondieron 90, todos ellos con resultados valorables, por lo que el porcentaje de participación es del 84,9%. Este porcentaje es similar al del último control de micobacterias, en el que se envió una cepa de *Mycobacterium abscessus* (87,7%) y al del control MB-2/14, en el que también se remitió una cepa de *M. tuberculosis* (89,2%).

IDENTIFICACIÓN

El Programa de Control de Calidad SEIMC aceptó como óptima la identificación de género y especie *M. tuberculosis* y como aceptables la del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium tuberculosis/Mycobacterium canetti* por la elevada similitud genética que presentan estas especies. De hecho, la mayoría de sistemas comerciales no son capaces de diferenciar las distintas especies del complejo *M. tuberculosis*.

Como puede observarse en la tabla 2, algo menos de la mitad de los centros (el 45,6%) informó correctamente la especie *M. tuberculosis*, mientras que otro 42,2% informó el complejo *M. tuberculosis* y un 6,7% informó *M. tuberculosis / M. canetti*, con lo que el porcentaje de acierto total fue del 94,5%.

Tabla 2. Resultados de la identificación.

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	41	45,6
Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38	42,2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> / <i>Mycobacterium canetti</i>	6	6,7
<i>Mycobacterium</i> (no <i>M. tuberculosis</i>)	2	2,2
<i>Mycobacterium bovis</i>	2	2,2
Género <i>Mycobacterium</i>	1	1,1
Total	90	100,0

MÉTODOS Y MARCAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN

Las técnicas empleadas mayoritariamente por los participantes fueron los métodos moleculares, destacando, en primer lugar, las pruebas de hibridación inversa, que se usaron, bien en solitario o bien combinadas con otro método (inmuncromatografía, PCR a tiempo real, sondas moleculares, espectrometría de masas, PCR-RFLP, características morfo-culturales o secuenciación) por 53 de los centros (58,9%). A continuación, le siguen otros métodos moleculares como la PCR a tiempo real, usada por 19 participantes (21,1%), y las sondas moleculares, empleadas por 16 centros (17,8%).

Respecto a la inmuncromatografía, si bien únicamente fue informada como método diagnóstico por 13 centros (14,5%), hubo otros 14 centros que expresaron en sus comentarios que habían realizado una técnica de inmuncromatografía pero obteniendo un resultado negativo. Así, habría un total de 27 laboratorios (30,0%) que utilizarían este método. Respecto a la espectrometría de masas, fue empleada por 11 laboratorios (12,2%), mientras que las pruebas bioquímicas clásicas únicamente fueron informadas por 3 participantes (3,4%), en todos los casos junto a algún método molecular.

Por último, de los 90 centros que enviaron la hoja de respuesta con datos analizables, sólo 2 (2,2%) no aportaron información al respecto. El conjunto de todos los métodos empleados por los participantes queda reflejado en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados para la identificación.

Método	Número	%
Hibridación inversa	28	31,2
PCR a tiempo real	11	12,3
Sonda	9	10,0
Hibridación inversa + inmuncromatografía	7	7,8
Espectrometría de masas	6	6,7
Hibridación inversa + PCR a tiempo real	5	5,6
Hibridación inversa + PCR-RFLP	2	2,2
Inmuncromatografía	2	2,2

Oligocromatografía	2	2,2
Sonda + hibridación inversa	2	2,2
Sonda + inmunocromatografía	2	2,2
Espectrometría de masas + hibridación inversa + secuenciación	1	1,1
Espectrometría de masas + pruebas bioquímicas	1	1,1
Espectrometría de masas + pruebas bioquímicas + PCR a tiempo real	1	1,1
Hibridación inversa + características morfo-culturales	1	1,1
Hibridación inversa + espectrometría de masas	1	1,1
Hibridación inversa + espectrometría de masas + <i>spoligotyping</i>	1	1,1
Hibridación inversa + inmunocromatografía + <i>spoligotyping</i>	1	1,1
Hibridación inversa + PCR a tiempo real + espectrometría masas	1	1,1
Pruebas bioquímicas + secuenciación	1	1,1
Sonda + hibridación inversa + inmunocromatografía	1	1,1
Sonda + hibridación inversa + PCR a tiempo real	1	1,1
Sonda + hibridación inversa + PCR-RFLP	1	1,1
No informa	2	2,2
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 de las tiras de hibridación inversa de GenoType MTBC (el 23,5% respecto al conjunto de las técnicas de identificación comerciales) y GenoType *Mycobacterium* CM (el 18,3%), ambas de Hain Lifescience. A continuación, le siguen las sondas de ácidos nucleicos Accuprobe® de Gen-Probe®, bioMérieux (8,7%) y la PCR a tiempo real GeneXpert® de Cepheid (7,0%). Todos estos sistemas moleculares obtuvieron un excelente índice de aciertos (100,0%) para la identificación del complejo *M. tuberculosis*. Hubo 8 centros (7,5%) que usaron el MALDI-TOF de Bruker o VITEK® MS, identificando correctamente siete de ellos la especie o el complejo *M. tuberculosis*, mientras que hubo un centro que informó *Mycobacterium bovis*.

Como ya se ha comentado, las diferentes técnicas comerciales de inmunocromatografía empleadas aportaron resultados negativos para la detección del complejo *M. tuberculosis* debido, probablemente, a que la cepa presentaba una delección o mutación en el gen codificante de la proteína MPT64. 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)	27	23,5	100,0
GenoType <i>Mycobacterium</i> CM (Hain)	21	18,3	100,0
Accuprobe® (Gen-Probe®, bioMérieux)	10	8,7	100,0
GeneXpert® (Cepheid)	8	7,0	100,0

MALDI-TOF (Bruker / VITEK® MS)	8	7,0	87,5
GenoType MTBDR _{plus} (Hain)	6	5,2	100,0
SD Biline TB Ag MPT64 (Standard Diag.)	5	4,3	0,0
INNO-LiPA® (Fujirebio)	4	3,5	100,0
BD MGIT™ TBc (Becton Dickinson)	2	1,7	0,0
Speed-oligo® Mycobacteria (Vircell)	2	1,7	100,0
TBCheck MPT64 (Hain)	1	0,8	0,0
No informa ^a	21	18,3	9,5
Total	115	100,0	75,7

^aIncluye inmunocromatografía (19), PCR a tiempo real (1), sonda (1).

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

El estudio fenotípico de sensibilidad fue realizado por 68 (75,6%) de los 90 centros que enviaron la hoja de respuesta con resultado evaluable. La técnica mayoritaria fue la dilución en medio líquido, realizada por 56 centros (el 82,4% de las respuestas con antibiograma), empleándose como método único por el 80,9%. Otros métodos empleados fueron el método de las proporciones manual (utilizadas por 6 centros, el 8,8% de las respuestas con antibiograma), la microdilución (5 centros, el 7,4%) y las tiras de gradiente de concentración (3 centros, el 4,4%). La totalidad de los métodos empleados se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Métodos empleados en el antibiograma.

Método	Número	%
Dilución en medio líquido	55	80,9
Proporciones	5	7,4
Microdilución	4	5,8
Tiras de gradiente de concentración	2	2,9
Dilución en medio líquido + microdilución	1	1,5
Proporciones + tiras de gradiente concentración	1	1,5
Total	68	100,0

En cuanto a los equipos comerciales empleados, destacan, en primer lugar, y como cabría esperar del análisis de métodos, el sistema automatizado BACTEC™ MGIT™ 960 de Becton-Dickinson, que fue usado por el 74,0% de los participantes. Otros cuatro centros (5,8%) realizaron también dilución en caldo pero utilizando el sistema VersaTREK™ de Thermo Scientific. A continuación, se encuentran las tiras de gradiente de concentración E-test® de bioMérieux (4,3%) y el panel de microdilución de Sensititre™ (4,3%). Como dato positivo, únicamente un 2,9% de los centros no informa de este dato, lo que refleja indirectamente que son cada vez más los laboratorios capacitados para realizar un antibiograma de *M. tuberculosis*. 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)	51	74,0
VersaTREK™ (Thermo Scientific)	4	5,8
E-test® (bioMérieux)	3	4,3
Sensititre™	3	4,3
Manual ^a	6	8,7
No informa ^b	2	2,9
Total	69	100,0

^aIncluye método proporciones (6).

^bIncluye dilución en medio líquido (1) y microdilución (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 68 laboratorios que realizaron el antibiograma, 51 (75,0%) emplearon los criterios del CLSI, otros 8 (11,8%) los publicados en la bibliografía, 6 (8,8%) informaron criterios del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), y los 3 centros restantes (4,4%) en base a los puntos de corte recomendados por el BACTEC™ MGIT™. Todos estos datos se resumen en la tabla 7.

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

Marca	Número	%
CLSI	51	75,0
Bibliografía	8	11,8
EUCAST	6	8,8
Según puntos de corte del fabricante	3	4,4
Total	68	100,0

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 10 antibióticos diferentes. Como se observa en dicha tabla, existe una excelente concordancia entre los laboratorios participantes y el valor asignado en cuanto a la sensibilidad de la cepa frente a todos los antimicrobianos ensayados.

Tabla 8. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos.

Programa de Control de Calidad SEIMC • Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

c/ Agustín de Betancourt, 13. Entrepant. 28003 Madrid • Tel: 91.5310990 • Fax: 91.5227505 • Correo electrónico: ccs@seimc.org

Antibiótico	Número	Categorización ^a		
		Sensible	Resistente	No interpreta
Estreptomina	60	46 (100,0)	0	0
Etambutol	66	65 (98,5)	1 (1,5)	0
Isoniacida	66	65 (98,5)	1 (1,5)	0
Pirazinamida	58	55 (94,8)	2 (3,5)	1 (1,7)
Rifampicina	66	65 (98,5)	1 (1,5)	0

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

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 todos los casos los **errores máximos** de interpretación (resultado obtenido en la categoría de sensible siendo resistente el valor asignado) fueron considerados como no aceptables por parte del Programa CCS.

UTILIZACIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO

De los 90 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 79 (87,8%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 3 indicaron que sí lo habían empleado (3,3%) y otros 8 (8,9%) lo usaron parcialmente.

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

Como ya se ha comentado, algunos participantes (18 centros) señalaron que la inmunocromatografía frente a la proteína MPT64 del complejo *M. tuberculosis* había sido negativa.

Seis centros indicaron que no detectaron ninguna mutación de resistencia con la hibridación inversa. Tres centros recomendaron tratamiento con isoniazida, rifampicina, pirazinamida (+/- etambutol) durante 6 meses.

Por último, tres laboratorios informaron que el antibiograma lo habían enviado a su centro de referencia, y otros dos que, de tratarse de una muestra clínica, habrían remitido la cepa a su centro de referencia.

Madrid, 5 de diciembre de 2016

El Coordinador del Programa de Control de Calidad SEIMC

Nota: Si los datos anteriores son incorrectos o consideran oportuno apelar los resultados, rogamos se dirijan a la Secretaría del Programa CCS.

Programa de Control de Calidad SEIMC • Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

c/ Agustín de Betancourt, 13. Entrepant. 28003 Madrid • Tel: 91.5310990 • Fax: 91.5227505 • Correo electrónico: ccs@seimc.org

