

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL MB-4/16

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 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 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 una micobacteria en medio de Löwenstein-Jensen. La micobacteria había sido aislada de un paciente de 71 años de edad, que acudía a la consulta de Neumología por presentar un cuadro de tos escasamente productiva, febrícula vespertina y pérdida del apetito que se había intensificado en el último mes. Estos síntomas no habían mejorado a pesar de que se le habían dado diversas tandas de antibiótico. Al contrario, la sensación disneica había empeorado. Como antecedentes de interés, el paciente relataba haber recibido en el último año un tratamiento prolongado con corticosteroides por problemas de "piel". Se le realizó una radiografía de tórax y se le recogieron muestras seriadas de esputo para estudio bacteriológico (sin aislamientos significativos) y de micobacterias. Aunque la baciloscopia directa resultó negativa, a los 14 días de incubación en medio líquido, creció la micobacteria que fue objeto del presente control.

Se solicitó a los centros 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 *Mycobacterium* MTBC, Hain Lifescience) y espectrometría de masas (MALDI-TOF, Bruker), y fue confirmada por secuenciación del ARN ribosómico 16S.

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

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

Los resultados de sensibilidad antibiótica de referencia (valor asignado antibiograma) fueron obtenidos mediante el método de concentración crítica con el sistema comercial BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE y PZA Kit (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 (consenso de expertos).

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

^aS: sensible.

PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 106 centros inscritos a este control, de los que respondieron 93. Uno de ellos comentó que no le había llegado la cepa, por lo que se analizaron 92 respuestas con resultados valorables, lo que supone un porcentaje de participación real del 86,8%. Este porcentaje es similar al del último control de micobacterias, en el que se envió una cepa de *Mycobacterium fortuitum* (83,0%) y al del control MB-4/15, en el que también se remitió una cepa de *M. tuberculosis* (84,9%).

IDENTIFICACIÓN

El Programa de Control de Calidad SEIMC aceptó como óptima la identificación de género y especie *M. tuberculosis* y como aceptables las identificaciones *M. tuberculosis*, *Mycobacterium canetti* y complejo *M. tuberculosis*.

Como puede observarse en la tabla 2, algo más de la mitad de los centros (el 53,3%) informó complejo *M. tuberculosis*, mientras que otro 41,3% informó correctamente la especie *M. tuberculosis*, y un 3,2% informó *M. tuberculosis* / *M. canetti*, por lo que el porcentaje de acierto total fue del 97,8%.

Tabla 2. Resultados de la identificación micobacteriana.

Identificación	Número	%
Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	49	53,3
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38	41,3
<i>M. tuberculosis</i> / <i>M. canetti</i>	3	3,2
Género <i>Mycobacterium</i>	1	1,1
<i>Mycobacterium bovis</i>	1	1,1

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

Total	92	100,0
-------	----	-------

MÉTODOS Y MARCAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN

La técnica más empleada por los participantes fue la hibridación inversa (n=43, 46,7%), usada de forma única o combinada con otros métodos (inmunocromatografía, PCR a tiempo real, pruebas bioquímicas, características morfo-culturales, PCR-RFLP, espectrometría de masas, sondas moleculares, o *spoligotyping*), seguida por la inmunocromatografía, informada por 31 participantes (33,7%). El conjunto de los métodos empleados se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados para la identificación.

Método	Número	%
Hibridación inversa	18	19,6
Inmunocromatografía	18	19,6
Hibridación inversa + inmunocromatografía	9	9,7
Espectrometría de masas	7	7,6
Sonda	7	7,6
PCR a tiempo real	5	5,4
Hibridación inversa + PCR a tiempo real	4	4,4
Hibridación inversa + pruebas bioquímicas	4	4,4
Oligocromatografía	3	3,3
Sonda + Inmunocromatografía	3	3,3
Hibridación inversa + características morfo-culturales	2	2,1
Hibridación inversa + PCR-RFLP	2	2,1
Espectrometría de masas + Bioquímica + PCR a tiempo real	1	1,1
Espectrometría de masas + sonda	1	1,1
Hibridación inversa + espectrometría de masas	1	1,1
Hibridación inversa + espectrometría de masas + <i>spoligotyping</i>	1	1,1
Pruebas bioquímicas + características morfo-culturales	1	1,1
Secuenciación	1	1,1
Sonda + hibridación inversa	1	1,1
Sonda + hibridación inversa + inmunocromatografía	1	1,1
No informa	2	2,1
Total	92	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 conjunto (agrupando los *kits* MTBC, CM y

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

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

MTBDR_{plus}) por 42 centros (el 38,9% respecto al conjunto de las técnicas de identificación comerciales). A continuación le sigue la tira de inmunocromatografía BD MGIT™ TBc de Becton Dickinson (13,0%). Todos los sistemas comerciales obtuvieron un excelente índice de aciertos para la identificación de la especie o el complejo *M. tuberculosis*, con dos únicos resultados discrepantes. Uno de ellos ocurrió con el MALDI-TOF de Bruker, en el que un centro respondió *Mycobacterium bovis*, y el otro con la inmunocromatografía de Alere, con la que uno de los centros que la utilizó obtuvo un resultado negativo, respondiendo género *Mycobacterium*. 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)	16	14,8	100,0
BD MGIT™ TBc (Becton Dickinson)	14	13,0	100,0
Accuprobe® (Gen-Probe®, bioMérieux)	10	9,3	100,0
GenoType <i>Mycobacterium</i> CM (Hain)	10	9,3	100,0
GenoType (Hain, no especifican el kit utilizado)	9	8,3	100,0
MALDI-TOF (Bruker)	8	7,4	87,5
GenoType MTBDR _{plus} (Hain)	7	6,5	100,0
GeneXpert® (Cepheid)	5	4,6	100,0
Alere Determine™ TB LAM	3	2,8	66,7
Speed-oligo® Mycobacteria (Vircell)	3	2,8	100,0
MALDI-TOF (VITEK® MS)	1	0,9	100,0
SD Biotec TB Ag MPT64 (Standard Diag.)	1	0,9	100,0
No informa ^a	21	19,4	100,0
Total	108	100,0	93,3

^aIncluye: inmunocromatografía (11), PCR a tiempo real (5), espectrometría de masas (2), sonda (2), hibridación inversa (1).

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a los 90 centros que realizaron la identificación de *M. tuberculosis* o de su complejo. De ellos 10 no realizaron el estudio fenotípico de sensibilidad, por lo que se analizó un total de 80 antibiogramas.

La técnica más empleada fue la dilución en medio líquido, informada por 73 centros (el 91,3% de las respuestas con antibiograma), empleándose como método único por el 88,8%. A continuación le siguen las tiras de gradiente de concentración, empleadas por 5 centros (6,3%), el 3,8% de forma única. 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	71	88,8
Tira gradiente de concentración	3	3,8
Dilución en medio líquido + microdilución	2	2,5
Proporciones	2	2,5
Disco-placa + tira de gradientes de concentración	1	1,2
Proporciones + tira de gradientes de concentración	1	1,2
Total	80	100,0

Respecto a los equipos comerciales empleados destaca el sistema automatizado BACTEC™ MGIT™ 960 de Becton Dickinson, que fue usado por el 83,8% de los participantes. Del resto, seis (7,5%) realizaron dilución en caldo con el sistema VersaTREK® de Thermo Scientific, y 5 (6,2%) utilizaron las tiras de gradiente de concentración E-test® de bioMérieux (6,2%). Como dato positivo, únicamente un 2,5% de los centros no aporta información a este respecto, lo que podría reflejar indirectamente una mejor capacitación para realizar el 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 para la obtención de la CMI.

Marca	Número	%
BACTEC™ MGIT™ (Becton Dickinson)	67	83,8
VersaTREK® (Thermo Scientific)	6	7,5
E-test® (bioMérieux)	5	6,2
No informa	2	2,5
Total	80	100,0

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS DE LOS PARTICIPANTES

En cuanto a los criterios utilizados para la interpretación del estudio de sensibilidad, de los 80 laboratorios que lo realizaron, 49 (61,3%) emplearon los criterios del CLSI, otros 17 (21,3%) informaron según criterios del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), 10 (12,5%) según los publicados en la bibliografía, y otros 3 centros (3,7%) utilizaron los puntos de corte recomendados por el BACTEC™ MGIT™ o por el VersaTREK®. Por último, hubo un centro (1,2%) que no informó de esta premisa. Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 7.

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

Marca	Número	%
CLSI	49	61,3
EUCAST	17	21,3
Bibliografía	10	12,5
Según puntos de corte del fabricante	3	3,7
No específica	1	1,2
Total	80	100,0

En total, se recibió resultados de 11 antibióticos diferentes. 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. Como se observa 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	Número	Categorización ^a			
		Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta
Estreptomicina	75	74 (98,7)	0	1 (1,3)	0
Etambutol	77	77 (100,0)	0	0	0
Isoniacida	77	74 (96,1)	0	3 (3,9)	0
Pirazinamida	63	57 (90,5)	0	4 (6,4)	2 (3,1)
Rifampicina	77	76 (98,7)	0	1 (1,3)	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 el antibiograma se consideran resultados **NO Aceptables** los **errores máximos** de interpretación (resultado obtenido en la categoría de sensible siendo el valor asignado resistente). Los errores menores y mayores, siempre que no supongan un cambio importante en el tratamiento del microorganismo estudiado, se consideran aceptables.

UTILIZACIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO

De los 92 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 85 (92,4%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo, 3 (3,3%) indicaron que sí lo habían empleado y 4 (4,3%) lo usaron parcialmente.

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

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

Nueve centros indicaron que no detectaron ninguna mutación de resistencia con la hibridación inversa, utilizando el *kit* GenoType MTBDRplus (Hain). Dos centros recomendaron tratamiento con isoniazida, rifampicina, pirazinamida (+/- etambutol) durante 6 meses.

Por último, dos 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.

Nota.- Todos los comentarios o sugerencias generales, clínicas, microbiológicas o terapéuticas que los participantes han considerado oportuno indicar, así como de lectura interpretada de antibiograma, no serán objeto de evaluación por parte del Programa CCS.

Madrid, 17 de junio de 2017

Concepción Gimeno Cardona

Coordinadora 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.

Nota: Las actividades subcontratadas por el Programa CCS son: el transporte de las muestras, el valor asignado, y los estudios de homogeneidad y estabilidad. Si en un determinado momento, se requiere la subcontratación de otras actividades diferentes a las indicadas anteriormente, serán debidamente informadas.

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

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