

## ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL MB-3/18

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 paciente de 36 años, procedente de Guinea Ecuatorial, que acudía al Servicio de Urgencias de un hospital por presentar, desde hacía más de tres semanas, un cuadro de malestar general, astenia, febrícula, tos con hemoptisis, y pérdida de peso. En la exploración, se auscultaron crepitantes en ambos campos pulmonares, y en la radiografía de tórax se observaron infiltrados intersticiales bilaterales con una cavitación en lóbulo superior derecho. Se recogió una muestra de esputo que se remitió al Servicio de Microbiología para estudio bacteriológico y de micobacterias. Se decidió su ingreso en Neumología, y al día siguiente, se le realizó una fibrobroncoscopia, remitiendo una muestra del broncoaspirado para estudio microbiológico. A los 8 días de incubación, los cultivos de ambas muestras en medio líquido de micobacterias fueron 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.

### VALOR ASIGNADO

El valor asignado de referencia para la identificación fue *Mycobacterium tuberculosis*. Este valor se obtuvo mediante hibridación inversa (GenoType MTBC de Hain Lifescience) y espectrometría de masas (MALDI-TOF, Bruker), y fue confirmado por secuenciación del ARN ribosómico 16S.

Los resultados de sensibilidad antibiótica del consenso de expertos (valor asignado antibiograma) fueron obtenidos por dilución en medio líquido (concentración crítica) con los reactivos comerciales BD BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE y PZA Kits y se muestran en la tabla 1. Para la interpretación de los resultados se usaron los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) correspondientes al complejo *M. tuberculosis*.

**Tabla 1. Valor asignado del antibiograma (consenso de expertos).**

Antibiótico	CMI (µg/mL)	Categorización <sup>a</sup>
Isoniacida	0,1	S
Rifampicina	1,0	S
Etambutol	5,0	R <sup>b</sup>
Pirazinamida	100	S
Estreptomina	1,0	S

<sup>a</sup>S: sensible; R: resistente.

<sup>b</sup>Nota: La cepa remitida presenta la mutación **Met306Val** en el gen *embB* con posición genómica 4247429, que determina una resistencia de bajo nivel a 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 consideró aceptables las respuestas que informaron la cepa como "sensible" al etambutol.

## PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 101 centros inscritos a este control, de los que respondieron 92, todos ellos con resultados valorables, por lo que el porcentaje de participación es del 91,1%. Este porcentaje es similar tanto al del último control de Micobacteriología, en el que se envió una cepa de *Mycobacterium smegmatis* (93,1% de participación), como también al del control MB-1/18, en el que también se remitió una cepa de *M. tuberculosis* (95,0% 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 canettii*.

Como puede observarse en la tabla 2, algo más de la mitad de los centros (51,1%) informó complejo *M. tuberculosis*, mientras que un 41,3% informó la especie *M. tuberculosis*, y un 7,6% respondió *M. tuberculosis* / *M. canettii*, por lo que el porcentaje de acierto total fue del 100,0%.

**Tabla 2. Resultados de la identificación micobacteriana.**

Identificación	Número	%
----------------	--------	---

Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	47	51,1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38	41,3
<i>M. tuberculosis</i> / <i>Mycobacterium canetti</i>	7	7,6
Total	92	100,0

## MÉTODOS Y MARCAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN

En cuanto a los métodos utilizados para la identificación, de los 92 centros que enviaron la hoja de respuesta, hubo un centro (1,1%) que no aportó información al respecto, recurriendo éste 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 (inmunocromatografía, PCR a tiempo real, sondas moleculares, *spoligotyping*, pruebas bioquímicas, o PCR-RFLP) por 44 de los centros (47,8%). A continuación, le siguen la inmunocromatografía (31 participantes, el 33,7%) y la PCR a tiempo real (23 participantes, el 25,0%). El conjunto de los métodos empleados se detalla en la tabla 3.

**Tabla 3. Métodos utilizados en la identificación.**

Método	Número	%
Inmunocromatografía	16	17,3
Hibridación inversa	15	16,3
PCR <sup>a</sup> a tiempo real	15	16,3
Hibridación inversa + inmunocromatografía	10	10,8
Espectrometría de masas	9	9,7
Hibridación inversa + PCR a tiempo real	8	8,7
Oligocromatografía	3	3,3
Sonda + hibridación inversa	3	3,3
Hibridación inversa + inmunocromatografía + <i>spoligotyping</i>	2	2,2
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa	2	2,2
Sonda	2	2,2
Sonda + hibridación inversa + inmunocromatografía	2	2,2
Hibridación inversa + espectrometría de masas	1	1,1
Hibridación inversa + PCR-RFLP <sup>a</sup>	1	1,1
Pruebas bioquímicas	1	1,1

Pruebas bioquímicas+ inmunocromatografía	1	1,1
No informa	1	1,1
Total	92	100,0

<sup>a</sup>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 GenoType Mycobacterium de Hain Lifescience, empleadas en su conjunto (agrupando los *kits* MTBC, MTBDR<sub>plus</sub>, CM, MTBDR<sub>s</sub>/ y NTM-DR) por 39 centros (el 43,3% respecto al conjunto de las técnicas de identificación comerciales). A continuación, le siguen las tiras de inmunocromatografía BD MGIT™ TBc de Becton Dickinson y los cartuchos Xpert® de Cepheid (cada uno informado por el 12,2% de los centros). Todos los sistemas comerciales utilizados 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)	23	25,5	100,0
BD MGIT™ TBc (Becton Dickinson)	11	12,2	100,0
Xpert® (Cepheid)	11	12,2	100,0
GenoType MTBDR <sub>plus</sub> (Hain)	6	6,7	100,0
MALDI-TOF (Bruker)	6	6,7	100,0
SD BIOLINE (Alere, Abbott)	5	5,5	100,0
GenoType Mycobacterium CM (Hain)	4	4,4	100,0
GenoType Mycobacterium (Hain) <sup>a</sup>	4	4,4	100,0
AccuProbe®	3	3,3	100,0
MALDI-TOF (VITEK® MS)	3	3,3	100,0
Speed-oligo® Mycobacteria (Vircell)	3	3,3	100,0
Anyplex™ II MTB/MDR/XDR (Seegene)	2	2,2	100,0
Anyplex™ II MTB/MDR (Seegene)	1	1,1	100,0
Capilia™ TB-Neo (Tauns)	1	1,1	100,0
GenoType MTBDR <sub>s</sub> / (Hain)	1	1,1	100,0
GenoType NTM-DR (Hain)	1	1,1	100,0
INNO-LiPA® (Fujirebio)	1	1,1	100,0

TBCheck MPT64 (Hain)	1	1,1	100,0
No informa <sup>b</sup>	3	3,3	100,0
Total	90	100,0	100,0

<sup>a</sup>No especifican el *kit* de GenoType utilizado.

<sup>b</sup>Métodos empleados: hibridación inversa (1), inmunocromatografía (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 los 92 centros que realizaron una identificación aceptable. De ellos, 21 no realizaron el estudio fenotípico de sensibilidad, por lo que se analizan un total de 71 antibiogramas.

La técnica más utilizada fue la dilución en medio líquido, informada por 67 centros (94,4% de las respuestas con antibiograma), empleándose como método único por el 90,2%. A continuación, le siguen las tiras de gradiente de concentración, empleadas por 5 centros (7,0%), el 4,2% de forma única. 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	64	90,2
Tira de gradientes de concentración	3	4,2
Dilución en medio líquido + microdilución	1	1,4
Proporciones + tiras de gradientes de concentración	1	1,4
Tira de gradientes de concentración + proporciones + microdilución	1	1,4
No informa	1	1,4
Total	71	100,0

Respecto a los sistemas comerciales empleados, destaca el equipo automatizado BACTEC™ MGIT™ 960 de Becton Dickinson, que fue usado por el 82,9% de los participantes. El resto realizó en 6 ocasiones (8,6%) una dilución en caldo con el sistema VersaTREK™ de Thermo Fisher Scientific, y en 3 (4,3%) 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)	58	82,9
VersaTREK™ (Thermo Fisher Scientific)	6	8,6
E-test® (bioMérieux)	3	4,3
MIC Test Strip (Liofilchem®)	1	1,4
No informa <sup>a</sup>	2	2,8
Total	70	100,0

<sup>a</sup>Uno informa método proporciones y el otro tira de gradiente de concentración.

## 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 71 laboratorios que lo realizaron, 46 (64,8%) informaron haber empleado los criterios del CLSI, 14 (19,7%) los criterios EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), y los 11 restantes (15,5%) 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	46	64,8
EUCAST	14	19,7
Bibliografía	11	15,5
Total	71	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), con la excepción del etambutol por la mutación comentada en la nota de la tabla 1 del valor asignado para el antibiograma.

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 17 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 esperable del etambutol; con este último antibiótico se asumió como válida cualquier interpretación informada, dada la dificultad para la interpretación en relación a la mutación comentada en el apartado del valor asignado.

**Tabla 8. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos**

Antibiótico	Nº	Categorización <sup>a</sup>			
		Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta
Isoniacida	70	69 (98,6)	0	1 (1,4)	0
Rifampicina	71	71 (100,0)	0	0	0
Estreptomicina	65	65 (100,0)	0	0	0
Etambutol	67	21 (31,3)	2 (3,0)	44 (65,7)	0
Pirazinamida	60	53 (88,3)	0	6 (10,0)	1 (1,7)

<sup>a</sup>Los números entre paréntesis indican porcentajes sobre el total de ensayos para cada antibiótico.

## UTILIZACIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO.

De los 92 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 83 (90,2%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 3 (3,3%) indicaron que sí lo habían empleado, y los 6 restantes (6,5%) lo usaron parcialmente.

## COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

El comentario mayoritario (19 centros) se refería a que la cepa de *M. tuberculosis* remitida era fenotípicamente resistente al etambutol. De ellos, cinco confirmaron genóticamente esta resistencia, al detectar una mutación en el gen *embB* mediante el *kit* de hibridación inversa GenoType MTBDR<sub>sl</sub> (Hain).

Cinco centros recomendaron distintos regímenes terapéuticos de tratamientos antituberculostáticos sin etambutol.

Cuatro centros indicaron que no detectaron ninguna mutación de resistencia a la isoniazida, rifampicina y fluoroquinolonas mediante el *kit* de hibridación inversa GenoType MTBDR<sub>plus</sub> (Hain).

Por último, dos 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, 15 de enero de 2019



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 de las muestras provenientes de cada uno de los lotes, siguiendo una estricta programación de tareas. 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 17043, las actividades subcontratadas que afectan al valor asignado y a los estudios de homogeneidad 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.