

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MICOBACTERIOLOGÍA CONTROL MB-4/21

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 a partir de un paciente varón de 80 años, diagnosticado de EPOC en grado moderado-severo, que había acudido a la consulta de Neumología por presentar, desde un mes y medio previo, aumento de su disnea habitual que se había intensificado a esfuerzos mínimos. Dicho síntoma, se había acompañado en las últimas tres semanas de tos escasamente productiva y febrícula vespertina. El cuadro no había cedido a pesar de diferentes tratamientos con antibióticos de amplio espectro. En el momento de la exploración, presentaba febrícula de 37,3°C y crepitantes en campo pulmonar derecho a la auscultación. La radiografía de tórax mostraba un infiltrado cavitado en el lóbulo pulmonar derecho con adenopatías hiliares, que no se había visto en la revisión del año anterior. Se recogieron tres muestras de esputo que fueron remitidas al Servicio de Microbiología para cultivo bacteriológico y de micobacterias. La baciloscopia fue positiva en una de las tres muestras; en el cultivo bacteriológico creció flora bacteriana habitual y a los 11 días de incubación en medio líquido automatizado, creció 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-4/21

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. El consenso de expertos usó 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
		CLSI (M62-1st ed-2018)
Isoniacida	≤0,1	S
Rifampicina	≤1	S
Pirazinamida	≤100	S
Etambutol	≤5	S
Estreptomicina	≤1	S

^aS: sensible.

PARTICIPACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 99 centros inscritos a este control, de los que respondieron 87, todos ellos con resultados valorables, por lo que el porcentaje de participación es del 87,9%. Este porcentaje es ligeramente inferior al del último control de Micobacteriología, en el que se envió una cepa de *Mycobacterium smegmatis* (91,9% de participación), aunque similar al del control MB-2/21, en el que también se remitió una cepa de *M. tuberculosis* (88,9% 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 canetti*, por la similitud existente entre las especies de micobacterias que componen este complejo.

MB-4/21

Como puede observarse en la tabla 2, más de la mitad de los centros (el 64,4%) informaron el complejo *M. tuberculosis*, mientras que un 33,3% informó correctamente la especie *M. tuberculosis* y un 2,3% respondieron *M. tuberculosis / M. canetti*; 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>	56	64,4
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	29	33,3
<i>M. tuberculosis / Mycobacterium canetti</i>	2	2,3
Total	87	100,0

MÉTODOS Y MARCAS EMPLEADOS EN LA IDENTIFICACIÓN

La técnica empleada mayoritariamente por los 88 participantes fue la hibridación inversa, usada, bien en solitario o bien combinada con otro método (espectrometría de masas, PCR a tiempo real, sondas moleculares, pruebas bioquímicas, inmunocromatografía, PCR-RFLP o *spoligotyping*) por 35 de los centros (el 39,8%). A continuación, le siguen la espectrometría de masas (23 centros, el 26,4%), la inmunocromatografía (23 participantes, el 26,4%) y la PCR a tiempo real (18 participantes, el 20,7%). El conjunto de los métodos empleados se detalla en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados en la identificación.

Método	Número	%
Inmunocromatografía	17	19,6
Espectrometría de masas	15	17,3
Hibridación inversa	13	15,0
PCR a tiempo real	11	12,7
Espectrometría de masas + hibridación inversa	6	7,0
Hibridación inversa + PCR a tiempo real	6	7,0
Sonda + hibridación inversa	3	3,5
Bioquímica + hibridación inversa	2	2,3
Espectrometría de masas + inmunocromatografía	2	2,3
Hibridación inversa + inmunocromatografía	2	2,3
Bioquímica + características morfo-culturales	1	1,1
Hibridación inversa + características morfo-culturales	1	1,1

MB-4/21

Hibridación inversa + inmunocromatografía + <i>spoligotyping</i>	1	1,1
Hibridación inversa + PCR-RFLP	1	1,1
Liquid Array®	1	1,1
Oligocromatografía	1	1,1
PCR	1	1,1
PCR a tiempo real + inmunocromatografía	1	1,1
Secuenciación	1	1,1
Sonda + hibridación inversa + PCR a tiempo real	1	1,1
Total	87	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 de Hain Lifescience (actualmente Bruker), empleadas en su conjunto (agrupando los *kits* MTBC, Mycobacterium CM, MTBDR*plus* y MTBDR*sl*) por 33 centros (el 39,8% respecto al conjunto de las técnicas de identificación comerciales). A continuación, le siguen el MALDI-TOF de Bruker (15,7%) y las tiras BD MGIT™ TBc (12,0%). 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)	21	25,3	21 (100,0)
MALDI-TOF (Bruker)	13	15,7	13 (100,0)
BD MGIT™ TBc (Becton Dickinson)	10	12,0	10 (100,0)
Xpert® (Cepheid)	8	9,6	8 (100,0)
SD BIOLINE (Abbott)	7	8,4	7 (100,0)
GenoType Mycobacterium CM (Hain, Bruker)	6	7,2	6 (100,0)
GenoType MTBDR <i>plus</i> (Hain, Bruker)	5	6,1	5 (100,0)
MALDI-TOF (VITEK® MS)	5	6,1	5 (100,0)
Allplex™ MTB/MDR/XDR _e (Seegene)	2	2,4	2 (100,0)
TBCheck MPT64 (Hain, Bruker)	2	2,4	2 (100,0)
Fluoro Type® MTBDR (Hain, Bruker)	1	1,2	1 (100,0)
GenoType MTBDR <i>sl</i> (Hain)	1	1,2	1 (100,0)
Speed-oligo® Mycobacteria (Viracell)	1	1,2	1 (100,0)

MB-4/21

No informa ^a	1	1,2	1 (100,0)
Total	83	100,0	100,0

^aMétodo: inmunocromatografía.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Para el análisis de las pruebas de sensibilidad se tuvo en cuenta a todos los 87 centros que realizaron la identificación de *M. tuberculosis* o de su complejo. De ellos, 21 no realizaron el estudio fenotípico de sensibilidad con lo que se analizaron un total de 66 antibiogramas.

La técnica más utilizada fue la dilución en medio líquido, empleada por 64 centros (el 97,0% de las respuestas con antibiograma), seguida de las tiras de gradiente de concentración (2 centros, el 3,0%). 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	62	94,0
Dilución en medio líquido + microdilución	1	1,5
Microdilución	1	1,5
Proporciones + tiras de gradientes de concentración	1	1,5
Tira de gradientes de concentración	1	1,5
Total	66	100,0

Respecto a los sistemas comerciales empleados, destaca el equipo automatizado BACTEC™ MGIT™ 960 de Becton Dickinson, que fue usado por el 95,5% de los participantes. 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)	63	95,5
Etest® (bioMérieux)	1	1,5
Sensititre™ (Thermo Scientific)	1	1,5
Versa TREK™ (Thermo Fisher Scientific)	1	1,5
Total	66	100,0

MB-4/21

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS CUALITATIVOS DE LOS PARTICIPANTES

Respecto a los criterios de puntos de corte utilizados para la interpretación del antibiograma, de los 66 laboratorios que lo realizaron hubo 54 (81,8%) que emplearon los criterios del CLSI y los 12 restantes (18,2%) informaron según los criterios de EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 7.

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

Criterio	Número	%
CLSI	54	81,8
EUCAST	12	18,2
Total	66	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 7 antibióticos diferentes, pero tan solo 5 fueron informados por 10 o más participantes.

Como se puede observar en dicha tabla, existe una buena concordancia entre los laboratorios participantes y el valor asignado frente a todos los antimicobacterianos ensayados, aunque llama la atención, los tres centros que informaron que la cepa era resistente a la pirazinamida y los dos centros que informaron la cepa como resistente al etambutol.

Tabla 8. Resultados cualitativos de sensibilidad a los antibióticos

Antibiótico	Nº	Categorización ^a				
		Sensible	Intermedio SEI	Resistente	No interpreta	Evidencia insuficiente
Estreptomicina	61	55 (90,2)	6 (9,8)	0	0	0
Etambutol	61	54 (88,5)	4 (6,6)	2 (3,3)	1 (1,6)	0
Isoniacida	63	57 (90,5)	6 (9,5)	0	0	0

MB-4/21

Pirazinamida	57	48 (84,2)	6 (10,5)	3 (5,3)	0	0
Rifampicina	60	54 (90,0)	6 (10,0)	0	0	0

^aLos números entre paréntesis indican porcentajes sobre el total de ensayos para cada antibiótico.
Abreviaturas: SEI (Sensible con exposición incrementada)

UTILIZACIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO.

De los 87 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 79 (90,8%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 2 (2,3%) indicaron que sí lo habían empleado y otros 6 (6,9%) lo usaron parcialmente.

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

Doce centros indicaron que no detectaron ninguna mutación de resistencia a la isoniacida y rifampicina.

Por último, dos centros comentaron que no pudieron hacer antibiograma por ausencia de crecimiento en los subcultivos. Por último, un laboratorio mencionó que el antibiograma informado se había enviado a un centro externo.

Madrid, 20 de marzo de 2022




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.

MB-4/21

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-4/21