

Anexo 3.

Información sobre actividades complementarias realizadas en tres laboratorios

Anexo 3.1. Laboratorio de Micobacterias. Centro Nacional de Microbiología (ISCIII)

El Laboratorio de Micobacterias del Centro Nacional de Microbiología –CNM– (ISCIII, Majadahonda, Madrid) es un laboratorio público que ofrece la realización de las siguientes pruebas:

- Identificación a nivel de especie de las cepas del complejo *M. tuberculosis* y de micobacterias no tuberculosas, mediante la utilización de métodos fenotípicos y genotípicos.
- Realización de antibiogramas de primera línea frente a los cinco antimicobacterianos (HRESZ) mediante la utilización de métodos líquidos de lectura automática y ampliación del estudio de sensibilidad en caso de resistencia a algunos de los anteriores frente a fármacos de segunda línea (PAS, kanamicina, cicloserina y ethionamida) y a otros antibióticos de amplio espectro (capreomicina, ofloxacina, amikacina y linezolid).
- Confirmación de resistencia a fármacos de primera línea por el método de las proporciones en medio de Löwenstein-Jensen
- Estudio de las bases moleculares de la resistencia, analizando los genes *katG*, *rrs*, *rpsL*, *rpoB*, *pncA* y los operones *inhA* y *embB*.
- Caracterización de brotes epidemiológicos, análisis de posibles contagios, diferenciar recaídas de reinfecciones y descartar o confirmar posibles contaminaciones de laboratorio.
- Participación en el programa de control de calidad externo de micobacterias del Grupo Europeo de Laboratorios de Referencia de Micobacterias, financiado por el ECDC.
- Dispone de sistemas de contención de microorganismos de grupo 3 de riesgo biológico, mediante un Laboratorio de Bioseguridad nivel

3 con control permanente de presiones y absolutamente estanco con respecto al resto del edificio homologado por el Ministerio de Industria.

- Mantiene un archivo de resultados y colección de aislamientos.

Papel que desarrolla el laboratorio en el diagnóstico de TB

El Laboratorio de Micobacterias del CNM desarrolla el siguiente trabajo de apoyo y complemento al diagnóstico de TB realizado en las CCAA:

- Identificación y antibiograma para las cepas de micobacterias aisladas en laboratorios de los centros sanitarios de diferentes CCAA que carecen de la estructura necesaria para el manejo de este tipo de cepas.
- Confirmación de los resultados de resistencia obtenidos en los estudios de sensibilidad mediante el sistema MGIT por aplicación del método de las proporciones en medio de Lowenstein-Jensen, no utilizado en los centros sanitarios debido a lo laborioso que resulta su elaboración, y la falta de medios comerciales que funcionen adecuadamente.
- Utilización de métodos genotípicos para la identificación de las especies de micobacterias no tuberculosas no identificables por los sistemas comerciales de uso habitual en los laboratorios de microbiología de los centros sanitarios.
- Estudio de las bases moleculares de la resistencia frente a los fármacos de primera línea, pero fundamentalmente frente a pirazinamida no disponible en el mercado.

Ejemplo de trabajo desarrollado por el laboratorio en los años 2009 y 2011

En el año 2009 recibió solicitud de realización de pruebas de 104 laboratorios procedentes de 15 CCAA y la ciudad de Melilla. Se identificaron 1.835 cepas del complejo tuberculoso y 1.047 cepas no tuberculosas. Se realizaron 1.750 antibiogramas de primera línea y 172 de segunda y tercera línea. Se confirmaron 19 brotes, se estudiaron las cepas de 5 pacientes para demostrar recaída o reinfección y se analizaron 17 cepas para confirmación de contaminaciones de laboratorio.

En el año 2011 recibió solicitud de realización de pruebas de 98 laboratorios procedentes de 16 CCAA y la ciudad de Ceuta. Se identificaron 1.425 cepas del complejo tuberculoso y 1.062 cepas no tuberculosas. Se realizaron 1.273 antibiogramas de primera línea y 204 de segunda y tercera línea. Se confirmaron 22 brotes, se estudiaron las cepas de 4 pacientes para demostrar recaída o reinfección y se analizaron 23 cepas para confirmación de contaminaciones de laboratorio.

Acreditación de técnicas de laboratorio

En el año 2013 está prevista la acreditación de las técnicas relacionadas con el estudio de sensibilidad, tanto por el método de las proporciones como por el sistema MGIT960 para todos los fármacos utilizados en el tratamiento antes mencionadas.

Anexo 3.2. Subred española de control de calidad externo para pruebas de sensibilidad en tuberculosis. Servicio de Microbiología del Hospital Vall d'Hebron, Barcelona

El Servicio de Microbiología del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona participa en la Red Mundial de Laboratorios Supranacionales de Referencia desde su creación en el año 1994.

La Red de Laboratorios Supranacionales de Referencia (LSR) da soporte a la Organización Mundial de la Salud (OMS) y a la Unión Internacional contra la Tuberculosis y la Enfermedad Pulmonar (IUATLD), en el Proyecto Global de Vigilancia de la TB resistente. Esta Red realiza un programa de garantía de calidad internacional con la finalidad de recoger datos de sensibilidad de *M. tuberculosis* que sean comparables. Actualmente, la Red está formada por 29 laboratorios y se coordina desde el Laboratorio de Micobacteriología del Instituto Tropical de Antwerp, Bélgica.

Cada LSR debe cumplir las siguientes funciones:

1. Mantener una buena concordancia en los controles internacionales para cada fármaco que debe ser superior al 90% en el caso de isoniacida y rifampicina.
2. Servir de apoyo a otros laboratorios especialmente a los Laboratorios Nacionales de Referencia.
3. Realizar controles de calidad en pruebas de sensibilidad de cepas de *M. tuberculosis* a otros laboratorios, preferiblemente en la zona geográfica en que se encuentren.
4. Disponibilidad del staff para realizar visitas periódicas a los centros que participen el control.
5. Realizar la vigilancia de resistencias para enviar los datos a la OMS.

El laboratorio del Servicio de Microbiología del Hospital Vall d'Hebron recibe anualmente 20-30 viales que corresponden a 10 cepas duplicadas de *M. tuberculosis* para realizar las pruebas de sensibilidad frente a isoniacida, rifampicina, etambutol y estreptomycin (HRES). Los resultados se envían al centro coordinador, que actualmente se encuentra en Antwerp, Bélgica. En cada control se evalúa la sensibilidad, especificidad, valor pre-

dictivo de resistencias, valor predictivo de sensibilidad, eficiencia y reproductibilidad; también se valora el tiempo que se tarda en enviar los resultados.

Además este centro es el coordinador de la **Subred española de control de calidad externo para pruebas de sensibilidad en tuberculosis**. Los laboratorios de España que voluntariamente desean participar deben de solicitarlo por escrito, tras lo cual se les envía un lote con 10 cepas de *M. tuberculosis* para la realización de antibiograma. Los resultados se evalúan y son confidenciales. Si los resultados no son satisfactorios, se discute con cada laboratorio donde pueden estar los posibles errores.

Cuando los resultados del control externo son satisfactorios y la CA está interesada en realizar un estudio de resistencias, se comunica a los responsables de OMS para que calculen la muestra representativa para cada CA. Para todo esto es mucho mejor que los epidemiólogos estén implicados, aunque no es imprescindible.

Este centro actúa de intermediario, ya sea con los epidemiólogos o con el responsable del laboratorio, para ponerse en contacto con OMS y que el laboratorio solicitante o la CA envíe los resultados directamente.

Hasta la fecha, 16 laboratorios de España han solicitado participar en este control de calidad externo. Actualmente, tres CCAA informan datos a la OMS sobre vigilancia de resistencias: Cataluña, Galicia y Aragón.

Anexo 3.3. Red Española de Vigilancia de la Tuberculosis Multirresistente. Grupo de Genética de Micobacterias Universidad de Zaragoza-IIS Aragón

El Grupo Investigación de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza-IIS Aragón (GGM-UZ) forma parte del CIBER de Enfermedades Respiratorias y entre sus actividades realiza, desde 1992, el estudio de las cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* a nivel nacional e internacional. Coordina la Red Española de Vigilancia de la Tuberculosis Multirresistente, y participa en la Red de Vigilancia de la Tuberculosis Multirresistente en Europa.

Red Española de Vigilancia de la Tuberculosis Multirresistente. La base de datos de cepas multirresistentes (TB-MDR) aisladas en los laboratorios de Microbiología del Sistema Nacional de Salud se mantiene de forma ininterrumpida desde 1998. En esta red participan el Laboratorio de Micobacterias del Centro Nacional de Microbiología (CNM) de Majadahonda (ISCIII) que aporta para su estudio molecular la totalidad de aislados de TB-MDR que recibe, los Centros de Referencia de Galicia y Aragón y otros hospitales que envían, directamente, aislamientos para su análisis molecular. La información obtenida se remite al Centro Nacional de Epidemiología y a las distintas CCAA (Boletín Epidemiológico Semanal 2007:15 (9): 97-108).

Se realiza la tipificación molecular de las cepas mediante los métodos estandarizados: RFLP-IS6110, MIRU-VNTR y Spoligotyping (<http://genmico.unizar.es>). Se estudian genéticamente las resistencias y los patrones obtenidos se analizan con el software estandarizado en Europa, permitiendo la comparación internacional de los aislamientos identificados.

Red de Vigilancia de la Tuberculosis Multirresistente en Europa. El ECDC puso en marcha la iniciativa «Vigilancia molecular de la TB-MDR en Europa». Este proyecto fue coordinado por el programa de TB-ECDC y por el Laboratorio Nacional de Referencia para Tuberculosis del RIVM de Holanda, punto focal para la recolección y mapeo de todos los datos moleculares. Desde ECDC y apoyado en la red de laboratorios nacionales de referencia de tuberculosis (ERLN-TB), a largo plazo, se proyecta la integración de la tipificación molecular en la vigilancia a nivel de la Unión Europea. El GGM-UZ, en colaboración con el Laboratorio de Micobacte-

rias del CNM de Majadahonda, proporciona los patrones moleculares de las cepas de TB-MDR identificadas en los laboratorios participantes en la Red.

Desde el año 1998, se han estudiado y analizado 726 cepas de *M. tuberculosis* multirresistente, de los que 39 corresponden al año 2009. La existencia de esta red de laboratorios ha permitido conocer que el número de casos de TB-MR se mantiene constante en el tiempo, detectar cambios en la población afectada, identificar los genotipos que con mayor frecuencia se relacionan con transmisión, así como detectar brotes de TB-MDR que han afectado a distintas CCAA y, en algunos casos, identificar la existencia de transmisión entre países del ámbito europeo e internacional.

Diagnóstico molecular

El GGM-UZ dispone de un Laboratorio de Bioseguridad nivel 3 y de la infraestructura necesaria para realizar de manera rutinaria la tipificación de la totalidad de los aislados de complejo *M. tuberculosis* en Aragón. Colabora con los laboratorios de las distintas CCAA en la realización de estudios poblacionales de tuberculosis, análisis de brotes e identificación de contaminaciones. Las técnicas utilizadas son: RFLP, MIRU-VNTR, Spoligotyping.

Este laboratorio realiza las pruebas anuales del control de calidad para la técnica de tipificación estandarizada de 24 MIRU-VNTR, que confiere garantía de calidad internacional. Estos controles están coordinados por el Laboratorio Nacional de Referencia para Tuberculosis de Holanda.

Adicionalmente, desde el año 1992, el GGM-UZ trabaja en diferentes líneas de investigación en el campo de las micobacterias, especialmente enfocada a la construcción y desarrollo de nuevas vacunas más eficaces que la actual BCG.

