VIRCELL MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT

Detección y diferenciación rápida y directa de la tuberculosis y de las principales infecciones por micobacterias no tuberculosas a partir de muestras respiratorias

Resumen ejecutivo

ASM Microbiology Spectrum ha publicado un estudio prospectivo, multicéntrico e independiente sobre la prueba MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT de Vircell:

Cano-Fernandez M, Barrado L, Bermudez-Marvalc H, Cabrera-Pineda M, Diaz-De-La-Torre I, Domingo D, Hernandez S. et al. Evaluation of clinical usefulness of a commercial multiplex PCR for diagnosing mycobacterial infections: a multicenter study. Microbiol Spectr. 2026 Jul 13:e0017526. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/42439557/

Este estudio prospectivo y multicéntrico se realizó en condiciones reales de uso e incluyó un elevado número de muestras. Sus resultados aportan una evidencia científica muy sólida sobre la utilidad del ensayo de PCR *multiplex* en tiempo real de Vircell para el diagnóstico rápido de las infecciones micobacterianas pulmonares. A lo largo de la nota técnica se presentan los principales hallazgos y se analiza su posible aplicación en la rutina del laboratorio.

El ensayo está diseñado para detectar directamente en muestras respiratorias el complejo *Mycobacterium tuberculosis* y las micobacterias no tuberculosas de mayor relevancia clínica. El estudio evaluó la capacidad del ensayo para detectar y diferenciar directamente el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), el complejo *Mycobacterium avium* (MAC) y el complejo *Mycobacterium abscessus* (MABSC) en muestras respiratorias. Se recogieron y analizaron prospectivamente 845 muestras en 15 laboratorios de microbiología clínica que prestaban servicio a 24 hospitales de la Comunidad de Madrid. Los resultados de la PCR *multiplex* de Vircell se compararon con el cultivo de micobacterias como método de referencia y con la tinción de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).

La prueba mostró un excelente comportamiento para MTBC, con una sensibilidad del 90,3 % y una especificidad del 98,5 %. La sensibilidad aumentó hasta el 96,3 % en las muestras con tinción de BAAR positiva. La especificidad superó el 99 % para MAC y MABSC, lo que respalda la muy elevada fiabilidad de los resultados positivos obtenidos para los tres complejos incluidos en el ensayo. Estos resultados respaldan la incorporación de la prueba de Vircell a los protocolos diagnósticos habituales, como herramienta rápida para diferenciar la tuberculosis de las principales infecciones por micobacterias no tuberculosas directamente a partir de muestras respiratorias.

Esta diferenciación tiene una repercusión clínica y analítica directa. La tinción de BAAR permite demostrar rápidamente la presencia de microorganismos ácido-alcohol resistentes, pero no distingue MTBC de las micobacterias no tuberculosas. Por su parte, la identificación mediante cultivo puede requerir varias semanas. Una diferenciación molecular más precoz puede facilitar el inicio correcto del tratamiento antituberculoso y la adopción de medidas de control de la infección. Cuando se detecta MAC o MABSC, también puede orientar el tipo de procedimiento posterior para la identificación y el estudio de sensibilidad.

Desde la perspectiva de una solución diagnóstica integral, esta publicación adquiere especial valor cuando la prueba MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT se presenta como parte del portfolio molecular de Vircell para el diagnóstico de las infecciones micobacterianas. El portfolio de Vircell va más allá de la detección directa en muestras respiratorias e incluye la prueba MTBC SPECIES REALTIME PCR KIT, destinada a la identificación posterior tanto del complejo *Mycobacterium tuberculosis* como de otras especies de Mycobacterium que causan tuberculosis, a partir de cultivos positivos. La oferta se completa con controles AMPLIRUN® tanto analíticos como de control de proceso completo,

para facilitar la verificación de los métodos y la gestión rutinaria de la calidad, así como sistemas automáticos de extracción y un *middleware* que facilita la interpretación de resultados y la conexión al sistema informático (LIS).

Introducción

Las infecciones respiratorias por micobacterias comprenden tanto la enfermedad causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* como la producida por un amplio grupo de microorganismos ambientales conocidos en su conjunto como micobacterias no tuberculosas (MNT).

La tuberculosis continúa siendo una de las principales causas de morbimortalidad por enfermedades infecciosas en todo el mundo. Al mismo tiempo, la enfermedad pulmonar por MNT está adquiriendo una relevancia creciente, especialmente en personas de edad avanzada, pacientes con alteraciones pulmonares estructurales y personas inmunodeprimidas.

Entre las MNT de mayor relevancia clínica se encuentran: El complejo *M. avium*, complejo *M. abscessus*, *M. kansasii* y *M. xenopi.*

El diagnóstico de la enfermedad pulmonar por MNT resulta complejo, ya que sus manifestaciones clínicas y radiológicas se solapan con frecuencia con las de la tuberculosis. Sin embargo, las implicaciones terapéuticas y de salud pública son muy diferentes.

La tuberculosis suele tratarse mediante pautas estandarizadas directas y puede requerir el aislamiento respiratorio inmediato del paciente, así como la realización de un estudio de contactos. En cambio, las infecciones por MNT suelen precisar tratamientos prolongados y específicos para cada especie que son determinados por el microorganismo implicado, su sensibilidad a los antimicrobianos y por las enfermedades subyacentes del paciente.

Por tanto, la diferenciación rápida entre MTBC y MNT es esencial para adoptar decisiones clínicas adecuadas. Los métodos diagnósticos convencionales no siempre permiten establecer esta diferenciación dentro de un plazo clínicamente útil. La tinción de BAAR es rápida, pero no permite distinguir MTBC de las MNT. El cultivo continúa siendo fundamental, aunque pueden transcurrir varias semanas hasta disponer de una identificación definitiva.

Las técnicas moleculares pueden acortar este intervalo diagnóstico al detectar y diferenciar directamente en muestras respiratorias las micobacterias de mayor relevancia clínica.

Tecnología del ensayo y posicionamiento previsto

MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT de Vircell es una prueba de PCR *multiplex* en tiempo real diseñado para la detección simultánea del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), complejo *Mycobacterium avium* (MAC), complejo *Mycobacterium abscessus* (MABSC) y del género completo de *Mycobacterium*. El ensayo incluye un control interno de RNasa P humana para verificar la idoneidad de la muestra y del proceso molecular.

En el caso de MAC, el ensayo detecta microorganismos pertenecientes al grupo *M. avium–intracellulare*, incluyendo *M. avium* subspecies, *M. intracellulare* y *M. chimaera*.

Según los autores, el ensayo debe posicionarse como un complemento rápido de la microscopía y el cultivo, y no como un sustituto de los métodos convencionales.

Este posicionamiento es importante porque, además de la detección específica de MTBC, MAC y MABSC, el ensayo incluye una diana para el género *Mycobacterium* que puede indicar la presencia de otras especies de micobacterias no incluidas en estos tres complejos. Un resultado positivo puede proporcionar una diferenciación temprana y clínicamente relevante. Sin embargo, un resultado negativo no excluye la infección, especialmente cuando el microorganismo se encuentra por debajo del límite de detección de la prueba o cuando la detección se ve afectada por una baja carga bacilar, la distribución heterogénea de los microorganismos en la muestra o determinados factores preanalíticos o analíticos.

En la práctica habitual, la prueba de Vircell puede utilizarse para agilizar la orientación diagnóstica inicial mientras el cultivo continúa procesándose en paralelo.

Evidencia aportada por la publicación

Diseño del estudio

Cano-Fernandez *et al*. realizaron un estudio prospectivo y multicéntrico entre junio de 2024 y julio de 2025. Participaron 15 laboratorios de microbiología responsables del procesamiento de cultivos de micobacterias para 24 hospitales de la Comunidad de Madrid.

Se recogieron un total de 845 muestras respiratorias de pacientes con sospecha clínica de infección micobacteriana, que se procesaron de acuerdo con los procedimientos habituales de cada laboratorio. En la Tabla 1 se muestra un resumen del diseño de este estudio.

Aspectos del estudio	Información de la publicación
Diseño del estudio	Evaluación clínica prospectiva y multicéntrica
Periodo del estudio	De junio de 2024 a julio de 2025
Laboratorios participantes	15
Número de Hospitales representados	24
Número total de muestras respiratorias	845
Tipo de muestra principal	Esputo (594)
Otros tipos de muestra	Aspirados bronquiales (146) Lavados broncoalveolares (98) Lavados bronquiales (7)
Método de referencia	Cultivo
Método adicional de comparación	Tinción de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR)
Prueba molecular	MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT
Procedimiento de extracción	MagXtract® 3200 Vircell Standard Extraction Plate SE001
Termociclador de RTPCR utilizado	Bio-Rad CFX96 Touch

Tabla 1: *Principales características del diseño del estudio multicéntrico.*

Procedimiento diagnóstico

Cada muestra se evaluó en paralelo mediante tres métodos diagnósticos: Tinción de BAAR, Cultivo de micobacterias y PCR múltiple en tiempo real de Vircell.

Para el análisis molecular, aproximadamente 1 mL de muestra se sometió a inactivación térmica a 95 °C durante 30 minutos. A continuación, se procesó una alícuota de 600 µL en el sistema automatizado MagXtract® 3200 utilizando la placa pre-dosificada Vircell *Standard Extraction Plate*, referencia SE001.

El procedimiento de extracción incluía una digestión con proteinasa K y una purificación mediante partículas magnéticas. Se obtenía un volumen de elución de 80 µL en aproximadamente 20 minutos por tanda. Posteriormente, se transferían automáticamente 5 µL de ácido nucleico extraído a los tubos de PCR liofilizados antes de la amplificación.

También se consultó a los laboratorios participantes en el estudio multicéntrico sobre el uso de otros ensayos moleculares para la detección de MTBC.

Resultados microbiológicos

El estudio incluyó 845 muestras respiratorias de pacientes con sospecha de infección micobacteriana: esputos (n = 594), aspirados bronquiales (n = 146), lavados broncoalveolares (n = 98) y lavados bronquiales (n = 7). La mediana de edad de los pacientes fue de 66 años y el 50,06 % eran mujeres.

El cultivo fue positivo en 301 muestras (35,6 %): MTBC (n = 156), MAC (n = 120) y MABSC (n = 25). De estas, 238 muestras (79,1 %) también presentaron una tinción de BAAR positiva. (Tabla 2).

En 29 casos, la tinción de BAAR fue positiva, pero el cultivo resultó negativo. La PCR fue positiva a pesar de que tanto el cultivo como la tinción de BAAR habían sido negativos en cinco casos: tres correspondientes a MABSC y dos a MTBC. En conjunto, la PCR *multiplex* de Vircell detectó alguno de los complejos micobacterianos en 245 muestras (29 %): MTBC (n = 147), MAC (n = 77) y MABSC (n = 21). Los resultados se detallan en la Tabla 2.

Comportamiento diagnóstico

El cultivo se utilizó como método de referencia para calcular la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo. El resumen de los resultados se muestra en la Tabla 3.

Resultado del cultivo	n	BAAR positivo	BAAR Negativo	PCR Multiplex con BAAR positivo	PCR Multiplex con BAAR negativo
MTBC	156	138	18	131	8
MAC	120	79	41	60	12
MABSC	25	21	4	15	3
Negativo	488	29	459	7	5

***Tabla 2**. Distribución de los resultados de la tinción de BAAR y de la PCR de Mycobacterium de Vircell en las muestras con cultivo positivo, según el complejo. Se excluyeron del análisis los cultivos contaminados y aquellos en los que se aislaron especies de Mycobacterium no incluidas entre las dianas del ensayo.*

Comportamiento para MTBC

El ensayo de PCR de Vircell mostró un excelente rendimiento diagnóstico para MTBC, con una sensibilidad global del 90,26 %, una especificidad del 98,53 %, un valor predictivo positivo del 95,20 % y un valor predictivo negativo del 96,55 %.

Cabe destacar que la sensibilidad aumentó hasta el 96,32 % en las muestras con tinción de BAAR positiva.

Los resultados de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo respaldan el uso del ensayo de Vircell para la detección rápida de MTBC, especialmente en pacientes con una carga bacilar elevada. En este contexto, un resultado molecular precoz puede facilitar el inicio del tratamiento y la adopción de medidas de control de la infección oportunos antes de disponer de la identificación mediante cultivo.

Además, la comparación de resultados del panel de muestras, también evaluadas con otros ensayos moleculares utilizados habitualmente en los laboratorios participantes para detectar MTBC, mostró un elevado grado de concordancia con el ensayo de PCR de Vircell, especialmente entre las muestras positivas.

Comportamiento para MAC

Para MAC, la sensibilidad global fue del 61,02 % y aumentó hasta el 76,92 % en las muestras con tinción de BAAR positiva. La especificidad fue del 99,37 % y el valor predictivo positivo, del 94,74 %. Esta menor sensibilidad global implica que un resultado negativo para MAC no debe utilizarse de forma aislada para descartar la infección, especialmente en pacientes con una sospecha clínica o radiológica elevada y una baja carga bacilar.

Esta limitación también se ha descrito en otras publicaciones sobre ensayos de PCR para MNT y probablemente refleja la heterogeneidad y la menor carga bacteriana que suelen asociarse a la enfermedad pulmonar por MNT. No obstante, la elevada especificidad y el alto valor predictivo positivo respaldan la relevancia clínica de un resultado positivo para MAC en la población evaluada.

Comportamiento para MABSC

Para MABSC, la sensibilidad fue del 72,00 % y la especificidad, del 99,58 %. El estudio solo incluyó 25 muestras con cultivo positivo para MABSC, por lo que los intervalos de confianza fueron más amplios que los observados para MTBC y MAC. Por tanto, este resultado respalda el rendimiento del ensayo, aunque su estimación es menos precisa.

Un resultado positivo para MABSC puede proporcionar información clínica temprana de utilidad, ya que las infecciones causadas por el complejo *M. abscessus* pueden requerir tratamientos complejos, prolongados y muy específicos.

Relevancia de las MNT en la población estudiada

La distribución de los cultivos positivos pone de manifiesto la relevancia diagnóstica de las MNT en la población evaluada. Entre las 301 muestras con cultivo positivo para alguno de los tres complejos incluidos como dianas específicas, 156 correspondieron a MTBC y 145 a MAC o MABSC. Por tanto, las MNT representaron el 48,2 % de estos cultivos positivos.

Además, el cultivo identificó otros 37 aislados pertenecientes a especies de MNT no incluidas específicamente en los tres complejos diana. Al considerar también estos aislados, las MNT

representaron 182 de las 338 muestras con cultivo micobacteriano positivo (53,8 %). En esta población, las MNT fueron, por tanto, ligeramente más frecuentes que MTBC entre los cultivos positivos.

Estos resultados muestran que la necesidad diagnóstica no se limita a confirmar rápidamente la tuberculosis o detectar resistencias. Ante una tinción de BAAR positiva, también resulta esencial determinar si la muestra contiene MTBC o una MNT, ya que la microscopía no permite realizar esta diferenciación y sus implicaciones clínicas, terapéuticas y de control de la infección son diferentes.

Comportamiento según el resultado de la tinción de BAAR

El estudio demostró que la sensibilidad del ensayo era generalmente mayor en las muestras con tinción de BAAR positiva, especialmente para MTBC y MAC.

Diana	Sensibilidad	Sensibilidad en muestras BAAR positivas	Especificidad	VPP	VPN
MTBC	90.26%	96.32%	98.53%	95.20%	96.55%
MAC	61.02%	76.92%	99.37%	94.74%	91.01%
MABSC	72.00%	71.43%	99.58%	85.71%	98.76%
Total	89.66%	89.36%	9748%	94.24%	87.18%

Tabla 3. *Comportamiento diagnóstico del ensayo PCR Vircell en tiempo real para la detección de micobacterias, en comparación con el cultivo.*

Esta relación refleja el efecto de la carga bacilar sobre la detección molecular. Las muestras con tinción de BAAR positiva suelen contener una concentración más elevada de micobacterias, lo que aumenta la probabilidad de que el ácido nucleico diana esté presente en la alícuota analizada mediante PCR.

Para MTBC, la sensibilidad aumentó del 90,26 % en el conjunto de las muestras al 96,32 % en las muestras con tinción de BAAR positiva. Para MAC, la sensibilidad aumentó del 61,02 % al 76,92 % en las muestras con tinción de BAAR positiva. Estos resultados refuerzan el valor de una interpretación conjunta:

- La tinción de BAAR aporta rápidamente información sobre la presencia de microorganismos ácido-alcohol resistentes y proporciona una estimación indirecta de la carga bacilar
- La PCR permite diferenciar de forma temprana los complejos incluidos en el ensayo.
- El cultivo confirma la presencia de microorganismos viables y permite realizar una identificación más amplia y estudios de sensibilidad.

Por tanto, la aportación clínica inmediata más relevante del ensayo de Vircell se produce probablemente cuando es necesario diferenciar rápidamente entre tuberculosis e infección por MNT en una muestra respiratoria con tinción de BAAR positiva.

Por qué se descontaminan las muestras antes del cultivo

Las muestras respiratorias proceden de localizaciones anatómicas no estériles y pueden contener grandes cantidades de bacterias y hongos comensales. Estos microorganismos suelen crecer más rápidamente que las micobacterias y pueden invadir el medio de cultivo, lo que podría impedir la recuperación o la detección del microorganismo de interés.

Por este motivo, antes de la inoculación del cultivo, las muestras respiratorias se someten a un procedimiento de digestión y descontaminación cuyos objetivos son: Licuar el moco y homogeneizar la muestra, liberar las micobacterias atrapadas en el material respiratorio, reducir la contaminación bacteriana y fúngica y concentrar las micobacterias viables antes de la inoculación.

El procedimiento se basa, en parte, en la resistencia relativa de MTBC a los reactivos alcalinos utilizados para la descontaminación. No obstante, las condiciones deben controlarse cuidadosamente. Una descontaminación insuficiente puede provocar un crecimiento excesivo de bacterias u hongos. En cambio, una descontaminación excesiva puede reducir la viabilidad de las micobacterias y comprometer la sensibilidad del cultivo. Este efecto es especialmente relevante para las MNT. La publicación explica que algunas MNT, en particular las micobacterias de

crecimiento rápido, pueden ser más sensibles que MTBC a los reactivos utilizados durante la descontaminación. En consecuencia, las células viables de MNT pueden resultar dañadas o destruidas durante el procesamiento, lo que reduce su recuperación en cultivo.

En el estudio, 19 cultivos se contaminaron con bacterias u hongos y fueron excluidos del análisis de comportamiento. Dos de estas muestras produjeron resultados positivos mediante PCR: una para MAC y otra para MTBC.

Este resultado ilustra el carácter complementario del cultivo y la PCR. El cultivo requiere microorganismos viables con capacidad de crecimiento, mientras que la PCR detecta el ácido nucleico diana y no depende de la viabilidad microbiana.

Interpretación de los resultados discrepantes

Resultados positivos mediante PCR y negativos por cultivo

Siete muestras fueron positivas para MTBC mediante el ensayo de PCR de Vircell, pero negativas mediante cultivo. De estas muestras, cuatro presentaban una tinción de BAAR positiva, una procedía de un paciente con un episodio previo de tuberculosis y, en otros cuatro casos, también se obtuvo un resultado positivo con otro ensayo molecular utilizado por los laboratorios participantes, como *GeneXpert®* MTB/RIF. Estos datos respaldan los resultados de PCR obtenidos con el ensayo de Vircell.

Esos resultados apoyan la compatibilidad y fiabilidad de, al menos, una parte de los resultados que han sido positivos mediante PCR y, sin embargo, negativos mediante cultivo.

Entre las posibles explicaciones para este fenómeno se encuentran la reducción de la viabilidad de los microorganismos tras el tratamiento, la pérdida de microorganismos viables durante la descontaminación o el procesamiento de las muestras, una concentración reducida de microorganismos viables, la persistencia de ADN micobacteriano procedente de una infección anterior o ya tratada o las diferencias entre las alícuotas utilizadas para el análisis molecular y para el cultivo.

La detección de ácido nucleico no siempre demuestra la existencia de enfermedad activa. Por tanto, los resultados positivos mediante PCR deben interpretarse junto con la presentación clínica del paciente, los hallazgos radiológicos, los antecedentes terapéuticos y el resto de los resultados microbiológicos.

Se obtuvieron dos resultados positivos para MAC mediante PCR y negativos mediante cultivo en pacientes con antecedentes documentados de infección por *M. intracellulare*. Este hallazgo también podría deberse a la persistencia de ADN o a la presencia de microorganismos que no se recuperaron en la alícuota destinada al cultivo.

Resultados positivos mediante cultivo y negativos mediante PCR

Un resultado negativo mediante PCR no excluye una infección micobacteriana. Entre las posibles explicaciones se encuentran una carga bacilar baja, la distribución heterogénea de los microorganismos en la muestra, las diferencias entre las alícuotas destinadas a la PCR y al cultivo, la inhibición de la PCR, una recuperación ineficiente de los ácidos nucleicos o una infección causada por una especie no perteneciente a los complejos incluidos como dianas específicas.

En este estudio, el cultivo identificó 37 aislamientos correspondientes a especies no identificadas específicamente en el panel de PCR. Entre ellas se encontraban *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. mucogenicum*, *M. lentiflavum*, *M. scrofulaceum*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. interjectum*, *M. shottsii* y *M. xenopi.*

Solo dos de estas muestras presentaron una tinción de BAAR positiva. Este resultado refuerza la necesidad de mantener el cultivo cuando persiste una sospecha clínica elevada de enfermedad micobacteriana.

Implicaciones clínicas y analíticas

Rápida orientación diagnóstica

El principal valor clínico del MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT reside en la diferenciación precoz de MTBC frente a MAC y MABSC directamente en muestras respiratorias.

Una de las principales aportaciones clínicas del ensayo de Vircell se produce ante una muestra respiratoria con tinción de BAAR positiva. La microscopía confirma la presencia de microorganismos ácido-alcohol resistentes, pero no permite distinguir entre MTBC y MNT. Esta incertidumbre puede conducir inicialmente a medidas de aislamiento respiratorio, investigación de contactos y tratamiento antituberculoso mientras se espera la identificación mediante cultivo.

La diferenciación molecular temprana de MTBC, MAC y MABSC, y detección genérica de otras micobacterias permite orientar estas decisiones el mismo día. La detección de MTBC puede respaldar la instauración rápida de las medidas de control de la tuberculosis y del tratamiento correspondiente. Por el contrario, la detección de MAC o MABSC puede orientar precozmente hacia una infección por MNT y contribuir a reevaluar medidas dirigidas específicamente frente a tuberculosis, evitando retrasos en la investigación y el manejo específico de estas infecciones. En este estudio, las MNT representaron aproximadamente la mitad de los cultivos micobacterianos positivos. A diferencia de las pruebas centradas en MTBC y resistencia a rifampicina, el ensayo de Vircell diferencia detectar MNT.

Apoyo para una toma de decisiones temprana en tuberculosis

La elevada sensibilidad observada para MTBC en muestras con tinción de BAAR positiva, del 96,32 %, junto con una especificidad del 98,53 %, permite respaldar una actuación rápida mientras se espera el resultado del cultivo. En un contexto clínico adecuado, un resultado positivo temprano para MTBC puede contribuir al inicio del tratamiento, al aislamiento respiratorio y a otras decisiones relacionadas con el control de la infección. El resultado debe interpretarse siempre junto con la información clínica, radiológica y microbiológica.

Orientación más temprana de las principales infecciones por MNT

La detección directa de MAC o MABSC puede indicar de manera precoz que el microorganismo pertenece a uno de los principales complejos de MNT y no a MTBC. Esta información puede ayudar a los laboratorios a priorizar los procedimientos posteriores de identificación mediante cultivo y de estudio de sensibilidad, y puede facilitar una valoración más temprana por parte de especialistas. No obstante, la detección molecular por sí sola no demuestra que se cumplan los criterios ATS/ERS/ESCMID/IDSA para el diagnóstico de la enfermedad pulmonar por MNT.

Uso complementario con la microscopía y el cultivo

El estudio respalda un protocolo integrado de trabajo en el que la tinción de BAAR permite estimar la carga bacilar, la PCR *multiplex* de Vircell proporciona una diferenciación rápida entre los complejos incluidos como dianas y en el que el cultivo confirma la presencia de microorganismos viables, detecta especies no incluidas en el panel y permite realizar estudios de sensibilidad. Por tanto, la PCR debe utilizarse para acelerar la orientación diagnóstica mientras el cultivo continúa en paralelo, y no para sustituirlo.

Mayor capacidad de respuesta ante cultivos problemáticos

La PCR puede proporcionar información útil cuando el cultivo se ve comprometido por la contaminación, la pérdida de viabilidad de los microorganismos durante la descontaminación, un tratamiento antimicrobiano previo o la distribución desigual de los microorganismos entre las distintas alícuotas.

Por el contrario, el cultivo continúa siendo esencial cuando la PCR es negativa, pero persiste la sospecha clínica, especialmente en infecciones con una carga bacilar baja o causadas por especies de MNT no incluidas entre las dianas del ensayo.

Consideraciones y limitaciones de este estudio

La publicación aporta una evidencia prospectiva y multicéntrica muy sólida por el elevado número de

muestras y laboratorios participantes. No obstante, los resultados deben interpretarse teniendo en cuenta las siguientes limitaciones:

- La evaluación incluyó exclusivamente muestras respiratorias. El comportamiento de la prueba no puede extrapolarse directamente a muestras extrapulmonares sin una validación adicional.
- Todos los laboratorios participantes estaban situados en la Comunidad de Madrid. El diseño multicéntrico mejora la representatividad de los resultados en condiciones de práctica real, pero la prevalencia local y la epidemiología de las MNT pueden influir en los valores predictivos y en la posibilidad de generalizar los resultados a otros entornos.
- El cultivo se utilizó como método de referencia, aunque puede verse afectado por la contaminación, el tratamiento previo, la baja viabilidad de los microorganismos y las pérdidas asociadas a la descontaminación, especialmente en algunas MNT. Por tanto, los resultados aparentemente positivos mediante PCR y negativos mediante cultivo no son necesariamente falsos positivos moleculares.
- La sensibilidad fue menor para MAC (61,02 %) y para MABSC (72,00 %), comparado con MTBC en el conjunto de muestras. Los resultados negativos deben interpretarse con precaución cuando existe una sospecha elevada de enfermedad por MNT o una carga bacilar baja. Además, la estimación para MABSC se basó únicamente en 25 muestras con cultivo positivo, por lo que presentó intervalos de confianza más amplios.
- El panel diferencia directamente MTBC, MAC y MABSC, pero no identifica todas las MNT clínicamente relevantes. El cultivo detectó 37 aislados pertenecientes a especies no incluidas en los complejos diana, lo que refuerza la necesidad de mantener el cultivo y otros métodos de identificación más amplios.
- La comparación con otros ensayos moleculares rápidos para muestra directa solo estuvo disponible para un número limitado de muestras y no se realizó sistemáticamente como método de referencia en todos los centros.
- No se dispuso de una correlación clínica y radiológica sistemática. Por tanto, el estudio evalúa el comportamiento microbiológico y la utilidad diagnóstica, pero no permite determinar si cada detección molecular correspondía a una enfermedad activa, una colonización o la persistencia de ADN tras una infección anterior o un tratamiento.
- Los resultados de la PCR no se comunicaron a los clínicos y no influyeron en el manejo de los pacientes. Por tanto, el estudio no evaluó directamente los cambios en el tiempo transcurrido hasta el inicio del tratamiento, las decisiones de aislamiento, la duración de la estancia hospitalaria ni los resultados clínicos de los pacientes.

Conclusiones

Los estudios prospectivos y multicéntricos de esta magnitud son poco habituales en la evaluación de ensayos diagnósticos. La inclusión de 845 muestras respiratorias procesadas en 15 laboratorios, en condiciones de práctica clínica real, aporta evidencias muy sólidas que respaldan el uso de MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT como herramienta molecular rápida para la detección y diferenciación directas de MTBC, MAC y MABSC, junto con la detección de otras micobacterias a nivel de género.

El ensayo mostró su mejor rendimiento para MTBC, con una sensibilidad del 90,3 %, que aumentó hasta el 96,3 % en las muestras con tinción de BAAR positiva, y una especificidad del 98,5 %. La sensibilidad fue del 61,0 % para MAC, aumentando hasta el 76,9 % en las muestras con tinción de BAAR positiva, y del 72,0 % para MABSC. La especificidad superó el 99 % para ambas dianas de MNT, lo que respalda una elevada confianza en los resultados positivos. La menor sensibilidad observada para las MNT es coherente con la carga bacilar más baja y heterogénea que suele asociarse a estas infecciones.

Los resultados también ponen de manifiesto la creciente relevancia diagnóstica de las MNT, que representaron aproximadamente la mitad de los cultivos micobacterianos positivos en la población evaluada. Ante una muestra con tinción de BAAR positiva, la diferenciación temprana de MTBC frente a

los principales complejos de MNT puede orientar las decisiones sobre aislamiento específico frente a tuberculosis, investigación de contactos y tratamiento mientras el cultivo continúa en paralelo. Esta diferenciación más amplia aporta información clínicamente relevante y complementaria a la proporcionada por los ensayos moleculares centrados en MTBC y resistencia a rifampicina. No obstante, la detección de una MNT no demuestra por sí sola enfermedad activa y debe interpretarse junto con los hallazgos clínicos, radiológicos y microbiológicos.

La integración con la extracción automatizada mediante MagXtract® 3200 y la amplificación en la plataforma abierta de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96 Touch proporciona a los laboratorios un protocolo de trabajo estandarizado y flexible. Este enfoque reduce considerablemente el tiempo necesario para diferenciar micobacterias con relevancia clínica en comparación con la identificación basada en cultivo, manteniendo el papel esencial del cultivo para la identificación completa de especies y el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos.

Más allá de un único ensayo: La solución molecular integral Vircell para micobacterias

Vircell ofrece un porfolio molecular integral para el diagnóstico de las infecciones por micobacterias que abarca la detección directa, la diferenciación de especies, la extracción automatizada, los controles de calidad y la conectividad del proceso diagnóstico, tal como se detalla en la Tabla 3.

Detección directa en muestras respiratorias

MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT permite detectar simultáneamente el género *Mycobacterium* y diferenciar directamente MTBC, MAC y MABSC. Está diseñado para proporcionar una orientación molecular rápida e inicial mientras la microscopía y el cultivo continúan en paralelo.

Identificación posterior a partir de cultivos positivos

MTBC SPECIES REALTIME PCR KIT (RTPCR022) amplía el proceso diagnóstico más allá de la detección inicial a nivel de complejo, al permitir una identificación molecular más detallada a partir de material procedente de cultivos positivos. Detecta y diferencia los principales miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, entre ellos *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG y *M. canettii*. En conjunto, los dos ensayos de PCR de Vircell aúnan la detección directa rápida con la caracterización posterior y proporcionan al laboratorio una visión diagnóstica más completa que la obtenida mediante un único resultado aislado.

Extracción automatizada integrada

El proceso diagnóstico evaluado en la publicación utilizó el instrumento MagXtract® 3200 junto con la placa pre-dosificada Vircell *Standard Extraction Plate SE001*. La extracción automatizada mediante partículas magnéticas y la preparación automatizada de la placa de PCR favorecen la estandarización, la trazabilidad y el procesamiento eficiente por lotes dentro de un proceso diagnóstico en formato de sistema abierto para PCR en tiempo real.

Apoyo para el control de calidad

Los controles AMPLIRUN® de Vircell complementan los ensayos moleculares con materiales caracterizados para la verificación completa del proceso, el control de calidad analítico, la formación de los técnicos de laboratorio y la monitorización rutinaria.

Los controles de proceso completo AMPLIRUN® TOTAL permiten evaluar conjuntamente la extracción y la amplificación. Por su parte, los controles analíticos AMPLIRUN® pueden utilizarse para comprobar dianas específicas de la PCR de acuerdo con el plan de calidad del laboratorio.

Flexibilidad de una plataforma abierta

La prueba PCR de Vircell se procesó en un termociclador Bio-Rad CFX96 Touch, lo que demuestra que el proceso diagnóstico puede implementarse en una plataforma abierta de PCR en tiempo real. Este enfoque ofrece a los laboratorios una mayor flexibilidad que las soluciones basadas exclusivamente en cartuchos cerrados y permite integrar la solución

Descripción	Referencia	Clase	Presentación
MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT	RTPCR016-LPD	CE0123 IVDR	96 test
MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT	RTPCR016-LP	CE0123 IVDR	24 test
MTBC SPECIES REALTIME PCR KIT	RTPCR022-LP-R	RUO	24 test
MagXtract® 3200	MAGXTRACT3200	CE	
STANDARD EXTRACTION PLATE	SE001	CE IVDR	96 test
STANDARD EXTRACTION TUBE	SE002	CE IVDR	96 test
VIRCOM PCR	VPCOM	CE	
AMPLIRUN® TOTAL MDR-TB VERIFICATION & CONTROL PANEL (SPUTUM)	MBTC027	CE	5x2 viales
AMPLIRUN® TOTAL MTB CONTROL (SPUTUM)	MBTC013	CE	10 viales
AMPLIRUN® TOTAL MTB INH RESISTANT CONTROL (SPUTUM)	MBTC015	CE	2x5 viales
AMPLIRUN® TOTAL MTB RIF RESISTANT CONTROL (SPUTUM)	MBTC014	CE	2x5 viales
AMPLIRUN® MYCOBACTERIUM AVIUM DNA CONTROL	MBC086-R	RUO	1 vial
AMPLIRUN® MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE DNA CONTROL	MBC087-R	RUO	1 vial
AMPLIRUN® MYCOBACTERIUM KANSASII DNA CONTROL	MBC095-R	RUO	1 vial
AMPLIRUN® MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DNA CONTROL	MBC034	CE0123 IVDR	1 vial
AMPLIRUN® MYCOBACTERIUM ULCERANS DNA CONTROL	MBC094-R	RUO	1 vial

Tabla 4. *Porfolio molecular de Vircell para el diagnóstico de las infecciones por micobacterias.*

para micobacterias en una infraestructura más amplia de diagnóstico molecular.

En conjunto, estos componentes posicionan a Vircell como un proveedor capaz de cubrir todo el circuito molecular de las micobacterias: detección directa rápida, Identificación posterior, extracción automatizada y apoyo en el control de calidad.

La propuesta de valor no se limita, por tanto, a un único ensayo de PCR *multiplex*, sino que comprende un procedimiento diagnóstico completo que los laboratorios pueden adaptar a rutinas de trabajo, su volumen de actividad y sus requisitos de calidad.

Sistema de comunicación middleware

VIRCOM® Molecular facilita la trazabilidad integral y la gestión estandarizada de los datos durante todo el proceso de trabajo molecular. Permite una integración completa con el sistema de información del laboratorio y ofrece una interpretación automática y sencilla de los resultados, incluidas las curvas de amplificación y los valores de Ct. El riesgo de errores humanos se reduce mediante la introducción de datos a través de un escáner, la creación automática de plantillas de trabajo con los controles correspondientes, el registro de los lotes y las fechas de caducidad de los reactivos, la identificación mediante códigos de color de los resultados positivos y negativos y una guía asistente para la validación de resultados.

Mensajes de recomendación para los usuarios finales

1. Detecte y diferencie de forma temprana.

Utilice MYCOBACTERIUM REALTIME PCR KIT para diferenciar rápidamente MTBC, MAC y MABSC mediante métodos moleculares, así como para detectar otras especies del género *Mycobacterium*, directamente en muestras respiratorias.

2. Interprete conjuntamente la tinción de BAAR y la PCR.

La tinción de BAAR indica la presencia y la carga aproximada de microorganismos ácido-alcohol resistentes. La PCR añade una diferenciación precoz entre los complejos incluidos como dianas.

3. Mantenga el cultivo en paralelo.

Mantenga el cultivo para recuperar microorganismos viables, detectar especies no incluidas en el panel de PCR, obtener una identificación definitiva y realizar estudios de sensibilidad a los antimicrobianos.

4. Interprete los resultados positivos en su contexto.

Un resultado positivo para MTBC puede respaldar el inicio apropiado del tratamiento antituberculoso y

también la adopción de medidas de control de la infección. Los resultados positivos para MAC o MABSC pueden orientar la investigación posterior de una posible infección por MNT, pero deben correlacionarse con los criterios clínicos, radiológicos y microbiológicos.

5. No utilice un resultado negativo por PCR como único criterio para descartar la enfermedad.

Una carga bacilar baja, la distribución heterogénea de los microorganismos en la muestra, la inhibición, una recuperación subóptima de los ácidos nucleicos o una infección por una MNT no incluida entre los complejos diana pueden producir un resultado negativo a pesar de que exista una infección activa.

6. Configure un protocolo diagnóstico completo.

Combine los ensayos de Vircell para la detección directa y la identificación a partir de cultivos con la extracción automatizada mediante MagXtract® y los controles de calidad AMPLIRUN® para disponer de una solución molecular estandarizada, trazable y flexible para el diagnóstico de las infecciones micobacterianas.

Referencias

1. Cano-Fernandez M, Barrado L, Bermudez-Marvalc H, Cabrera-Pineda M, Diaz-De-La-Torre I, Domingo D, Hernandez S, et al. Evaluation of clinical usefulness of a commercial multiplex PCR for diagnosing mycobacterial infections: a multicenter study. Microbiol Spectr. 2026; e00175-26. doi:10.1128/spectrum.00175-26.

2. Aguilera Franco M, Sampedro Padilla A, Gutierrez-Bautista JF, Gonzalez Martinez A, Cobo F, Gutierrez-Fernandez J, et al. Evaluation of the Mycobacterium RealTime Kit Vircell assay for detecting Mycobacterium species in clinical specimens. Pathogens. 2025;14:429. doi:10.3390/pathogens14050429.

3. Johansen MD, Herrmann J-L, Kremer L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of Mycobacterium abscessus. Nat Rev Microbiol. 2020;18:392–407. doi:10.1038/s41579-020-0331-1.

4. Ratnatunga CN, Lutzky VP, Kupz A, Doolan DL, Reid DW, Field M, et al. The rise of non-tuberculosis mycobacterial lung disease. Front Immunol. 2020;11:303. doi:10.3389/fimmu.2020.00303.

5. Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, Cambau E, Wallace RJ Jr, Andrejak C, et al. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. Eur Respir J. 2020;56:2000535. doi:10.1183/13993003.00535-2020.

6. Kim J-U, Ryu D-S, Cha C-H, Park S-H. Paradigm for diagnosing mycobacterial disease: direct detection and differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex and non-tuberculous mycobacteria in clinical specimens using multiplex real-time PCR. J Clin Pathol. 2018;71:774–780. doi:10.1136/jclinpath-2017-204945.

7. Broncano-Lavado A, Barrado L, Lopez-Roa P, Cacho J, Domingo D, Hernandez S, et al. Clinical evaluation of nontuberculous mycobacteria (NTM) elite agar, a new medium for the isolation of NTM: a multicenter study. J Clin Microbiol. 2023;61:e00036-23. doi:10.1128/jcm.00036-23.

8. Martin I, Pfyffer GE, Parrish N, Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, et al. Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In: Manual of Clinical Microbiology. 12th ed. Washington, DC: ASM Press; 2019. p. 558–575.

9. Buijtels PCAM, Petit PLC. Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. J Micr obiol Methods. 2005;62:83–88. doi:10.1016/j.mimet.2005.01.010.

proceso de trabajo molecular. Permite una integración completa con el sistema de información del laboratorio y ofrece una interpretación automática y sencilla de los resultados, incluidas las curvas de amplificación y los valores de Ct. El riesgo de errores humanos se reduce mediante la introducción de datos a través de un escáner, la creación automática de plantillas de trabajo con los controles correspondientes, el registro de los lotes y las fechas de caducidad de los reactivos, la identificación mediante códigos de color de los resultados positivos y negativos y una guía asistente para la validación de resultados.