

Se envió a 78 centros una cepa de *Mycobacterium smegmatis* en medio de Löwestein-Jensen que había sido aislada de un paciente varón de 34 años intervenido quirúrgicamente de una fractura abierta de tibia. Al cabo de treinta días de la intervención, persistía un dolor en la zona de la herida quirúrgica, el paciente presentaba febrícula y se le diagnosticó una osteomielitis del hueso implicado. Se le trató con vancomicina, sin buena evolución, apareciendo una inflamación del tejido celular subcutáneo y un exudado que fue remitido al laboratorio de Microbiología para realizar cultivos bacterianos y fúngicos convencionales, con resultado negativo en todos ellos. En el medio Löwenstein-Jensen, crecieron, a los cinco días, unas colonias de bacilos ácido-alcohol resistentes motivo del presente control. Se solicitó a los participantes que llevaran a cabo la **identificación** de esta cepa y, caso de ser procedente, realizaran **pruebas de sensibilidad**. También se les pidió que formularan **comentarios breves** si lo consideraban oportuno.

La cepa fue identificada por el laboratorio que actuó como centro de referencia mediante las características y pruebas bioquímicas señaladas en la Tabla 1. La identificación fue confirmada mediante la amplificación del gen *hsp65* y posterior restricción del amplificado (PCR-RFLP).

**Tabla 1. Identificación de la cepa de *M. smegmatis* según el laboratorio que actuó de referencia<sup>a</sup>.**

Característica / Prueba bioquímica	Resultado
Crecimiento a 37°C (24°C-45°C)	+
<b>Crecimiento rápido (&lt;7 días, 7H10)</b>	<b>+</b>
Colonias lisas (L) o rugosas (R)	R/L
<b>Cromogenicidad</b>	<b>No</b>
<b>Arilsulfatasa 3 días</b>	-
Niacina	-
Crecimiento en NaCl 5%	+
Crecimiento agar McConkey	-
<b>Reducción de nitratos</b>	<b>+</b>
Captación de Fe	+
Catalasa a 68 °C	+
Catalasa (>45 mm)	+
Reducción del telurito	+

<sup>a</sup>En negrita, la pruebas clave.

Se recibieron 63 cuestionarios de los 78 enviados, lo que supone sólo un 80,8% de participación. Un total de 24 centros (38,1%) identifican la micobacteria como *M. smegmatis*. Un participante no puede distinguir entre *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium smegmatis* y otro entre *Mycobacterium phlei* y *Mycobacterium thermoresistibile*. En tres centros identifican la cepa sólo como "micobacteria de crecimiento rápido" (en un caso como probable *M. smegmatis*). Otro laboratorio comenta que se trata de una micobacteria atípica que no puede identificar con las sondas comerciales disponibles, y cuatro no informan identificación alguna. Hay también participantes que no encuadran la cepa dentro de las micobacterias. Así, uno comenta que se trata de un bacilo Grampositivo, sin identificar la especie, y dos que se trata de una especie de corinebacteria (*Corynebacterium pseudodiphthericum* en un caso y *Corynebacterium pseudotuberculosis* en otro). Otras identificaciones a mencionar son las de un centro que la identifica como *Nocardia farcinica* y otro como perteneciente al género *Tsukamurella* (Tabla 2). El porcentaje bajo de aciertos (tomando como referencia *M. smegmatis*), unido a la identificación de la cepa como bacilo Grampositivo por algunos de los participantes, confirma que se trata de una micobacteria de difícil identificación en los laboratorios, lo que en un principio se presuponía desde la dirección del Programa de Control de Calidad.

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

Identificación	Número	%
M. smegmatis	24	38,1

M. fortuitum	16	25,4
Micobacteria de crecimiento rápido	3	4,8
Complejo <i>M. fortuitum</i>	2	3,2
Género <i>Mycobacterium</i>	2	3,2
<i>M. smegmatis</i> - <i>M. thermoresistibile</i>	1	1,6
<i>M. thermoresistibile</i> - <i>M. phlei</i>	1	1,6
<i>M. fortuitum</i> - <i>M. smegmatis</i>	1	1,6
<i>Mycobacterium chelonae</i>	1	1,6
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1	1,6
<i>Mycobacterium simiae</i>	1	1,6
<i>Mycobacterium marinum</i>	1	1,6
Bacilos Gram-positivos	1	1,6
<i>Corynebacterium pseudodiphthericum</i>	1	1,6
<i>Corinebacterium pseudotuberculosis</i>	1	1,6
<i>Nocardia farcinica</i>	1	1,6
Género <i>Tsukamurella</i>	1	1,6
No realiza la identificación	4	6,3
Total	63	100,0

A pesar de las dificultades previsibles, el nivel general de identificación se puede considerar aceptable, puesto que cinco laboratorios no alcanzan la identificación de especie, otros cinco la informan como bacterias de géneros distintos a *Mycobacterium* y cuatro la informan como micobacterias distintas a *M. fortuitum* o *M. smegmatis*, que son las que pueden confundirse más fácilmente entre sí. Puede considerarse hasta cierto punto lógico, que un 25,4% de los participantes hayan identificado la cepa como *M. fortuitum*, frente a un 38,1% que lo hace correctamente como *M. smegmatis*, ya que las características bioquímicas de estas especies son muy semejantes, diferenciándose únicamente mediante la prueba bioquímica de la arilsulfatasa. Es una micobacteria con una débil ácido-alcohol resistencia, que explica la confusión con bacilos grampositivos. Se suponía un nivel de identificación aún mas bajo, puesto que es una micobacteria cuya identificación se basa en sus características de crecimiento y en pruebas bioquímicas de realización manual, y no con sondas comerciales que, por la organización de los servicios de Microbiología, son posiblemente más fáciles de realizar en la actualidad que algunas pruebas de micobacteriología clásica.

Hay 59 participantes que indican el método usado para la identificación. El más frecuente fue la utilización de las pruebas bioquímicas, realizadas por 49 centros, 42 de ellos (71,2%) de forma exclusiva. De estos últimos, 16 identifican la cepa como *M. smegmatis*, y otros tantos como *M. fortuitum* (incluyendo los que no distinguen la especie dentro de este complejo). El resto se reparte entre una miscelánea de identificaciones, entre las que se incluyen otras especies de micobacterias. Las características de la cepa que han sido citadas por los participantes como las que más les han ayudado a su identificación han sido: el crecimiento rápido en menos de siete días, la reducción de nitratos, la ausencia de arilsulfatasa, la ausencia de fotocromogenicidad, el no crecimiento en el medio McConkey y el crecimiento en presencia de un 5% de NaCl. Los dos centros que informan la identificación como *Nocardia farcinica* y género *Tsukamurella*, respectivamente, comentan que la han realizado mediante pruebas bioquímicas, pero sin especificar cuáles. Seis participantes utilizan métodos moleculares, a veces complementados con otras técnicas. De los dos que utilizan sondas comerciales, uno identifica la cepa como *M. fortuitum* y el otro no llega a identificarla. Los cuatro restantes emplean el método PRA o de restricción del amplificado de la proteína de 65 kDa, complementando a la identificación bioquímica en tres ocasiones, y a la cromatografía y las pruebas bioquímicas en la restante. De los tres que utilizan las pruebas bioquímicas y el método PRA conjuntamente, dos identifican la cepa como *M. smegmatis* y el otro como *M. smegmatis* / *M. thermoresistibile*. De los cuatro participantes que usan la cromatografía, tres realizan la identificación correcta de la especie *M. smegmatis* (siempre complementada con pruebas bioquímicas y PRA). El centro que utiliza la cromatografía líquida (HPLC) exclusivamente informa la identificación de *M. fortuitum*. Por último, dos centros utilizan el método de API Coryne para realizar la identificación de la cepa, a la que consideran un bacilo Grampositivo. Uno de estos centros es el que la identifica como *C. pseudodiphthericum* y el otro como *C. pseudotuberculosis*. Cinco participantes no refieren el método de identificación empleado (Tabla 3).

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

Identificación	Número	%
Pruebas bioquímicas	42	71,2
Pruebas bioquímicas + PRA	3	5,1

Pruebas bioquímicas + cromatografía de gases	2	3,4
API Coryne	2	3,4
Pruebas bioquímicas+cromatografía+PRA	1	1,7
Pruebas bioquímicas+sondas	1	1,7
Sondas	1	1,7
Cromatografía HPLC	1	1,7
Cultivo	1	1,7
No informan	5	8,5
Total	59	100,0

La sensibilidad a los antibióticos informada por el laboratorio de referencia se resume en la Tabla 4. Este centro señala que no es aconsejable llevar a cabo pruebas de sensibilidad de forma habitual, habida cuenta de la baja patogenicidad que presenta esta especie. En caso necesario, según el laboratorio de referencia, servirían como orientación los métodos de disco-placa, si bien no existen criterios específicos y la interpretación se ha hecho valorando conjuntamente las CMI obtenidas y los halos de inhibición.

**Tabla 4. Sensibilidad de la cepa de *M. smegmatis* según el centro de referencia.**

Antimicrobiano	Método E-test®		Disco-placa	
	CMI (µg/ml)	Interpretación	Halo (mm)	Interpretación
Cefoxitina	>256	R	0	R
Cotrimoxazol	<= 0,002	S		S
Doxiciclina	0,023	S		
Tobramicina	0,19	S		S
Amikacina	0,19	S		S
Imipenem	>32	R	0	R
Clarithromicina	1,5-2	NI		
Ciprofloxacino	0,032	S		S
Rifampicina	24	R	0	R

El estudio de la sensibilidad a los antibióticos fue realizado en 39 (63,9 %) de los centros que respondieron. Un total de 3 laboratorios, consideran que no procede dicho estudio porque no está normalizado el método para micobacterias atípicas. Según se especifica en la tabla 5, el método disco-placa fue el más utilizado para las pruebas de sensibilidad, seguido del E-test®. Los resultados de sensibilidad se resumen en la tabla 6.

**Tabla 5. Métodos utilizados en el estudio de la sensibilidad.**

Método	Número	Porcentaje
Disco-placa	11	28,2
Disco-placa + E-test®	9	23,0
E-test®	5	12,8
Elución	1	2,5
Microdilución + E-test®	1	2,5
Disco-placa + MBBACT®	1	2,5
EspII System®	1	2,5
Sensititre®	1	2,5
Disco-placa + Sensititre®	1	2,5
Disco-placa + BACTEC®	1	2,5

Disco-placa + CMI	1	2,5
Dilución	3	7,6
Sin especificar	3	7,6
Total	39	100,0

Tabla 6. Resultados de las pruebas de sensibilidad de los participantes.

Antibiótico	Sensible		Intermedio		Resistente	
	Número	%	Número	%	Número	%
Amikacina	25	96,1	1	3,8	–	–
Cefoxitina	3	–	1	–	13	–
Ciprofloxacino	29	93,5	2	6,4	–	–
Claritromicina	10	–	2	–	5	–
Cotrimoxazol	19	82,6	2	8,7	2	8,7
Doxiciclina	24	100,0	–	–	–	–
Eritromicina	1	–	1	–	12	–
Imipenem	10	–	1	–	5	–
Ofloxacino	9	–	–	–	1	–
Isoniazida	–	–	–	–	5	–
Estreptomina	6	–	–	–	–	–
Etambutol	4	–	1	–	2	–
Etionamida	–	–	–	–	2	–
Tobramicina	3	–	–	–	2	–
Rifampicina	1	–	–	–	11	–

En el caso de la amikacina, ciprofloxacino, rifampicina y, sobre todo, doxiciclina, la coincidencia entre los participantes y los datos aportados por el centro usado como referencia es muy elevada. Para la cefoxitina y el cotrimoxazol, el porcentaje de coincidencia es elevado, pero menor del 80% (hay que tener en cuenta también el bajo número de participantes que aportan datos de sensibilidad). La variabilidad es muy elevada para el imipenem, que es informado como resistente por el centro de referencia y como sensible por la mayoría de los participantes. La sensibilidad a la claritromicina, no interpretable según el centro de referencia, es informada como sensible, intermedia y resistente por 10, dos y cinco, respectivamente, de los 17 laboratorios que ofrecen datos al respecto, reflejando la disparidad en los datos obtenidos, así como en los criterios de interpretación.

Sólo 24 centros (38,1%) hacen algún comentario. En tres ocasiones comentan que no hacen el antibiograma por no estar normalizado el método de sensibilidad para las micobacterias atípicas o porque no existen criterios de interpretación admitidos. Otros tres participantes especifican que están pendientes de recibir los resultados de un laboratorio externo de referencia, y otro más comenta que se trata de una cepa de *M. fortuitum*, pero que la enviaría a un centro de referencia para confirmar dicha identificación. Dos centros comentan que no es un bacilo ácido alcohol-resistente; uno de ellos dice que debe ser un error del Programa de Control de Calidad y la informa como *C. pseudodiphthericum* y el otro que no encaja en un perfil de micobacteria de crecimiento rápido y la informa como *C. pseudotuberculosis*. El centro que identifica la bacteria como bacilo grampositivo sin especificar la especie hace referencia en sus comentarios a que la muestra estaba probablemente contaminada por un bacilo de este tipo. Dos centros comentan que se trata de un *M. fortuitum*, pero que el cultivo estaba contaminado, en un caso, y en el otro que sería conveniente incubar durante más tiempo para que así creciese la micobacteria convencional que sospechan se ha enviado para control. En ambos casos, parece que existen dudas sobre la identificación, más porque piensan que no es lógico que se envíe dos veces seguidas la misma micobacteria (*M. fortuitum* fue objeto del control MB 1/00) que porque duden de sus resultados. Por último, un centro informa de que el perfil de antibiograma es compatible con *M. smegmatis* y otro hace hincapié en que es un aislado poco frecuente.

La utilización de un laboratorio externo de referencia es escasa, ya que 49 de los 60 centros (81,7%) que aportan este dato dicen no utilizarlo. Diez centros comentan específicamente su uso, en un centro lo utilizan de forma parcial (se desconoce para qué, puesto que identifican una corinebacteria en el material de control) y en tres casos no contestan a dicha pregunta. Así pues, como ya se ha comentado, los laboratorios que participan en el control de micobacterias poseen un grado aceptable de autosuficiencia, no sólo para la identificación y para la realización del antibiograma de especies atípicas con metodología comercial (tal y como se ha demostrado en otros controles), sino también para realizar pruebas bioquímicas clásicas, como ocurre en el presente.