

CONTROL DE CALIDAD DE MICOBACTERIAS (MB-1/03)

En el presente control se envió a los distintos centros participantes una cepa de *Mycobacterium kansasii* en medio de Löwestein-Jensen que había sido aislada de un paciente varón de 42 años de edad, seropositivo para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que acudió a la consulta por presentar un cuadro de 15 días de evolución con febrícula, tos y expectoración. La radiografía de tórax mostró un infiltrado con sospecha de cavitación en el lóbulo izquierdo. La prueba de tuberculina PPD y el estudio de anergia fueron negativos. Su último recuento de CD4 fue de 87 células/ μ l. Como antecedentes de interés, cabe destacar que el paciente había sido ingresado hacia dos meses por un cuadro de fiebre, tos, expectoración y un pequeño infiltrado intersticial izquierdo, que fue tratado empíricamente con cotrimoxazol intravenoso, con resolución clínica. Al ser atendido de nuevo, se tomó una muestra de esputo y se remitió al laboratorio de Microbiología, donde se llevó a cabo el examen microscópico directo y el cultivo bacteriológico, incluyendo micobacterias. El cultivo convencional fue negativo, pero en el tubo de Löwestein-Jensen se observó, al cabo de 15 días, el crecimiento de unas colonias de bacilos ácido-alcohol resistentes con al tinción de Ziehl-Neelsen.

Se solicitó a los participantes la identificación de la cepa y que realizaran, si fuera procedente, las pruebas de sensibilidad a los antimicobacterianos, así como que formularan comentarios, sugerencias o una valoración clínica sobre el caso que nos ocupa. La cepa fue identificada como *M. kansasii* por el laboratorio que actuó como centro de referencia mediante las características y pruebas bioquímicas señaladas en la Tabla 1.

Tabla 1. Identificación de la cepa de *M. kansasii* según el laboratorio que actuó de referencia^a.

Característica / Prueba bioquímica	Resultado
Crecimiento lento (>7 días)	+
Crecimiento a 37°C	+
Crecimiento a 45°C	–
Colonias lisas (S) o rugosas (R)	R/S
Fotocromogenicidad	+
Reducción de nitratos	+
Arilsulfatasa (3 días)	–
Pirazinamidas (4 días)	–
Ureasa	+
Niacina	–
Catalasa a 68°C	+
Catalasa semicuantitativa (>45mm)^b	+
Hidrólisis del Tween80 ®	+
Tolerancia NaCl 5% (28°C)	–
Crecimiento en TH2 (10 μ g/ml)	+
Crecimiento en McConkey sin cristal violeta	–

^aEn negrita, las pruebas clave.

^bSe describen dos grupos de cepas de *M. kansasii*: los productores de enfermedad con >45 mm de burbujas y los no productores de enfermedad con <45mm de burbujas.

Se recibieron 75 hojas de respuesta de los 92 cuestionarios enviados, lo que supone un porcentaje de participación real del 81,5%. Todos llevaron a cabo la identificación de la cepa, encuadrándola correctamente dentro del grupo de las micobacterias, aunque uno de los participantes la identifica como un bacilo ácido alcohol resistente ya que sólo realiza una tinción de Ziehl-Neelsen. Como puede observarse en la tabla 2, el nivel de acierto es elevado, dado que el 88,1% de los centros identifica la micobacteria como *M. kansasii* y, de éstos, un 14,7% la encuadra dentro del grupo 1 de dicha especie, siendo ambas respuestas válidas para el Control de Calidad.

Tabla 2. Resultados de la identificación de la cepa

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium kansasii</i>	55	73,4
<i>Mycobacterium kansasii</i> grupo I	11	14,7
Género <i>Mycobacterium</i>	2	2,7
Micobacteria atípica	2	2,7
<i>Mycobacterium avium</i> complex	1	1,3
<i>Mycobacterium gordonae</i>	1	1,3
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	1	1,3
<i>Mycobacterium</i> (no tuberculosis)	1	1,3
Bacilo ácido-alcohol resistente	1	1,3
Total	75	100,0

En cuanto al resto de laboratorios, como puede observarse en la figura 1, aportan distintos resultados: uno de ellos, comenta que se trata de una “micobacteria no tuberculosa”, otro afirma que es un bacilo ácido-alcohol resistente, dos aportan una identificación genérica, y otros dos afirman que se trata de una micobacteria atípica. El resto de las respuestas recibidas corresponden a tres centros que informaron de tres especies de micobacterias distintas: complejo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium gordonae* y *Mycobacterium scrofulaceum*.

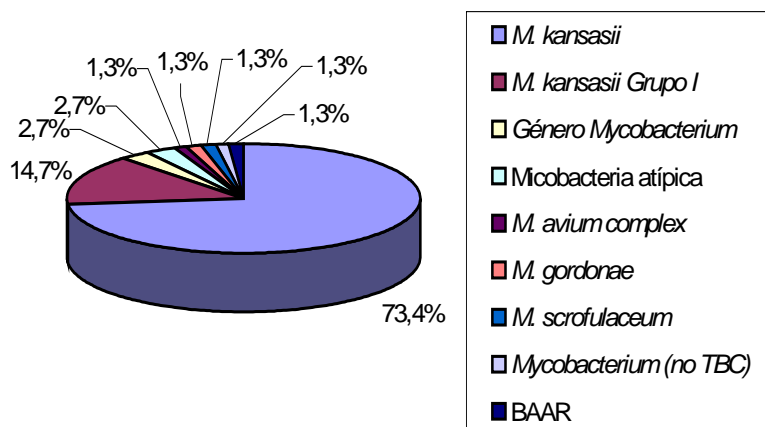


Figura 1. Distribución de los resultados de identificación.

De los 75 laboratorios que llevaron a cabo la identificación, tan sólo 3 centros (4,0%) no mencionan el método utilizado; dos de ellos identifican la cepa como *M. kansasii* y el otro como *M. kansasii* grupo 1. Las sondas de ácidos nucleicos comerciales son empleadas como única técnica de identificación por 25 participantes (33,4%), ocho centros (10,7%) la utilizan en combinación con pruebas bioquímicas, tres (4,0%) con PCR-RFLP, uno (1,3%) en combinación con una técnica de hibridación inversa, uno (1,3%) teniendo en cuenta las características morfo-culturales y, finalmente, un centro (1,3%) que combina con bioquímica y PCR-RFLP.

La realización de las pruebas bioquímicas clásicas fue empleada por 28 laboratorios (37,4%); en 18 de ellos (24,1%) de forma aislada o teniendo en cuenta las características morfo-culturales y en 10 (13,3%) junto con otros métodos de identificación (PCR-RFLP, sonda, técnicas moleculares). En todos los casos el porcentaje de acierto en la identificación de la cepa fue muy alto, de forma que tan sólo dos centros que emplearon pruebas bioquímicas y características morfo-culturales dieron un resultado erróneo. Cabe señalar que, los dos participantes que sólo realizan una tinción de Ziehl-Neelsen aportan una identificación genérica de la cepa como Género *Mycobacterium* y BAAR. Los datos correspondientes al método empleado en la identificación quedan reflejados en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados para la identificación.

Identificación	Número	%
Sonda	25	33,4
Pruebas bioquímicas + características morfo-culturales	12	16,1
Pruebas bioquímicas + sonda	8	10,7
Hibridación inversa	6	8,0
Pruebas bioquímicas	6	8,0
No informa	3	4,0
Sonda + PCR-RFLP	3	4,0
Tinción de Ziehl-Neelsen	2	2,8
Pruebas bioquímicas + métodos moleculares	1	1,3
Pruebas bioquímicas + Sonda + PCR-RFLP	1	1,3
Cromatografía (HPLC)	1	1,3
Cultivo en Lowenstein-Jensen	1	1,3
Hibridación	1	1,3
PCR-RFLP	1	1,3
Secuenciación + PCR-RFLP	1	1,3
Sonda + características morfo-culturales	1	1,3
Sonda + hibridación inversa	1	1,3
Velocidad de crecimiento + fotosensibilidad	1	1,3
Total	75	100,0

Por lo que respecta a las marcas comerciales empleadas, existe una lógica correlación con las técnicas utilizadas en la identificación de la cepa. En primer lugar, llama la atención el elevado número de participantes que no aportan información a este respecto (29,4%). Un número idéntico de los mismos no aporta marca establecida, correspondiéndose, en este caso, con los que emplean técnicas manuales. Como se puede observar en la tabla 4, son 21 laboratorios de los 39 que dicen emplear una sonda de ácidos nucleicos en la identificación los que informan la marca: Accuprobe®/Gen-Probe. Por otro lado, los seis participantes que informan la hibridación inversa como método, indican que el equipo comercial es el de InnoLipa® (Innogenetics). No se puede decir que exista una correlación definitiva entre el tipo de método empleado y la identificación correcta de la cepa, aunque bien es cierto que los

laboratorios que combinaron pruebas bioquímicas y métodos moleculares tienen mayor índice de acierto, y sobretodo capacidad para llegar a la identificación de especie, incluso de grupo, que los que se apoyan únicamente en las características morfo-culturales y pruebas bioquímicas.

Tabla 4. Marcas comerciales utilizadas para la identificación.

Marcas comerciales	Número	%
Manual	22	29,4
Accuprobe® Genprobe (bioMérieux)	21	28,0
InnoLipa® (Innogenetics)	6	8,0
Becton-Dickinson	1	1,3
Accuprobe® (bioMérieux) + InnoLipa (Innogenetics)	1	1,3
Multigen Detection System Mycobacteria	1	1,3
Probetec® (Becton-Dickinson)	1	1,3
No informa	22	29,4
Total	75	100,0

El estudio de sensibilidad a los antibióticos fue realizado por 34 (45,3%) de los 75 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa. De ellos, cuatro participantes (11,8%) no aportan datos sobre el método ni marca comercial empleados. De los que sí informan acerca de la técnica usada en la realización del antibiograma, cabe destacar los 19 centros (55,9%) que informan un método de dilución en medio líquido y que, en todos los casos, se corresponde con equipos comerciales automatizados. En segundo lugar, destacan las tiras de E-test®, que fueron empleadas por cinco participantes (14,7%) y en tercer lugar hay que mencionar los cuatro centros (11,8%) que emplearon el método de las proporciones. Todos estos datos están resumidos en la tabla 5. Cabe señalar, que hay un laboratorio que refiere haber empleado dos métodos de estudio de sensibilidad: tiras E-test® y el sistema fluorométrico MGIT® 960, obteniéndose el mismo perfil de sensibilidad en ambos casos. Algún participante, varió la técnica empleada según el antibiótico probado. Generalmente, en los casos en que se utilizaban dos técnicas, el sistema Bactec® o el método de las proporciones eran empleados para los antituberculosos clásicos.

Tabla 5. Métodos empleados en el estudio de sensibilidad.

Método	Número	%
Dilución en medio líquido	19	55,9
E-test®	5	14,7
No informa	4	11,8
Método de las proporciones	4	11,8
CMI	1	2,9
Difusión en agar 7H11	1	2,9
Total	34	100,0

En cuanto a las marcas comerciales empleadas, y como cabría esperar de los datos de metodología del antibiograma, destacan, en primer lugar, los equipos comerciales automatizados de Becton-Dickinson, MGIT® 960 y Bactec®460, que son empleados por 15 participantes (44,1%). Otros métodos comerciales de dilución en medio líquido, como MB/Bact® y Trek®, son empleados por cuatro y tres laboratorios, respectivamente. Cuatro participantes emplean tiras E-Test®. Esto datos se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Marcas comerciales para el estudio de sensibilidad.

Marca	Número	%
Bactec®MGIT 960 (BD)	10	29,5
Bactec® 460 TB (BD)	5	14,7
MB/Bact® (bioMérieux)	4	11,8
E-test®	4	11,8
ESPCulture System II (Trek)	3	8,8
Otros	3	8,8
No informa	5	14,7
Total	34	100,0

Por lo que respecta a los antibióticos estudiados, destaca su amplia variedad, lo que en parte se puede explicar por la falta de un criterio claro a la hora de elegir los fármacos ideales para este tipo de micobacteriosis. De hecho, y como se comentará más adelante, son varios los participantes que en sus comentarios remarcan la ausencia de normalización del antibiograma para esta micobacteria. De todos modos, son los tuberculostáticos clásicos, junto con la claritromicina y la amikacina, las drogas mayoritariamente ensayadas (tabla 7). La rifampicina es estudiada por el 100% de los 34 participantes; de los que 31 informan la cepa sensible, con un amplio intervalo de CMI cuyo valor modal fue 1 µg/ml. Tan sólo dos participantes informan resistencia a este antibiótico y otro aporta un resultado indeterminado. La sensibilidad a la isoniacida se lleva a cabo en 28 centros, de los que 20 informan de la resistencia de la cepa (valor modal de CMI 0,1 µg/ml). La estreptomycinina es estudiada por 23 (67,6%) centros y es informada como resistente por 13 participantes, con CMI variable entre 1 y 64, sin embargo son ocho los centros que aportan un resultado discrepante con el del laboratorio de referencia, informando la cepa como sensible con una CMI entre 1 y 6. El etambutol es informado

por 28 laboratorios (82,4%), mostrándose la cepa sensible al mismo en 22 ocasiones, con un valor modal de 5 µg/ml. Finalmente, la pirazinamida es estudiada por 10 centros (29,4%), siendo sensible para ocho de ellos.

Tabla 7. Resultados de las pruebas de sensibilidad.

Antibiótico	Sensible	Intermedio	Resistente	No informa	Total
Rifampicina	31	1	2	–	34
Isoniacida	6	1	20	1	28
Etambutol	22	–	5	1	28
Estreptomina	8	1	13	1	23
Pirazinamida	2	–	8	–	10
Claritromicina	5	–	–	–	5
Amikacina	3	–	1	–	4
Etionamida	4	–	–	–	4
Levofloxacino	2	–	1	–	3
PAS	–	–	3	–	3
Cotrimoxazol	2	–	1	–	3
Ciprofloxacino	–	–	2	–	2
Kanamicina	–	–	2	–	2
Ofloxacino	2	–	–	–	2
Linezolid	2	–	–	–	2
Azitromicina	–	–	1	–	1
Cefoxitina	–	–	1	–	1
Eritromicina	1	–	–	–	1
Imipenem	–	–	1	–	1
Rifabutina	1	–	–	–	1
Tetraciclina	–	–	1	–	1

Los datos aportados por los participantes, permiten deducir que, de forma genérica, se obtuvo un perfil de resistencia a la isoniacida, estreptomina (en este caso los resultados son más variables, condicionados por la falta de criterios uniformes) y a la pirazinamida, y sensibilidad al etambutol y rifampicina, coincidente con el aportado por el laboratorio de referencia. Este patrón es también el más común en esta especie, en donde se suele encontrar resistencia a la isoniacida, estreptomina y pirazinamida, y sensibilidad al etambutol; la sensibilidad a la rifampicina es variable. Como puede observarse en la tabla, aunque el número de participantes es bajo, la cepa de control mostraba un perfil de sensibilidad a la claritromicina, amikacina y etionamida. Por último, cabe destacar la sensibilidad a las quinolonas y a la linezolid, aunque el número de pruebas es anecdótico y no hay datos del centro de referencia.

USO DEL LABORATORIO EXTERNO

De los 75 centros que llevan a cabo la identificación de la cepa, 60 (80,0%) afirman no haber utilizado un laboratorio de referencia, seis (8,0%) no informan sobre tal cuestión y nueve (12,0%) indican que sí lo utilizan, cinco de ellos de forma parcial. Como ya comentamos en anteriores controles y, a tenor de los datos aportados, se puede decir que un porcentaje considerable de los laboratorios que participan en el Control de Calidad disponen de suficientes recursos manuales o técnicos para llevar a cabo el estudio de micobacterias, sobre todo en lo que respecta a la identificación de cepas.

COMENTARIOS

Un total de 38 centros (50,6%) hacen algún comentario sobre la cepa remitida por el Control de Calidad, su tratamiento o aspectos clínicos del caso. Con respecto a la significación clínica, hay seis centros que realizan algún comentario. De ellos, cuatro indican que el cuadro clínico sugiere que *M. kansasii* es el agente causal, dado que se trata de un paciente infectado por el VIH, en los que esta especie es la segunda causa de enfermedad pulmonar por micobacterias no tuberculosas. Además, otros dos centros comentan que son necesarios varios aislamientos repetidos para considerar a la cepa como causante del cuadro clínico.

En cuanto al tratamiento, son nueve los centros que comentan algo al respecto; en general, coinciden en recomendar una terapia combinada, excepto uno de ellos que apunta como tratamiento de elección la monoterapia con rifampicina. Son cinco los participantes que recomiendan isoniacida + rifampicina + etambutol durante 12 meses y dos los que defienden dar isoniacida + rifampicina + etambutol durante dos meses y rifampicina + isoniacida durante 10 meses más. Finalmente, un laboratorio comenta que debe tratarse como si fuera un *Mycobacterium tuberculosis* pero sin dar pirazinamida.

Por lo que respecta a la conveniencia o no de realizar un antibiograma, son siete los centros que afirman en sus comentarios que no procede, bien porque se trata de una micobacteria atípica, porque sólo existe un aislamiento o porque el tratamiento al paciente será independiente del resultado del antibiograma. Hay dos participantes que establecen únicamente la necesidad de estudiar la sensibilidad a la rifampicina. Finalmente, son seis los laboratorios que afirman en sus comentarios que no existe un antibiograma normalizado para *M. kansasii* y uno de ellos comenta que no lo realiza, pues el sistema Bactec® 460 no es útil para el estudio de sensibilidad de este tipo de micobacterias.