

CONTROL DE CALIDAD DE MICOBACTERIAS (MB-2/03)

En el este control se envió a los laboratorios participantes una cepa de *Mycobacterium bovis* en medio de Löwestein-Jensen. Había sido aislada de un paciente varón de 32 años de edad, procedente de Marruecos, que había acudido al hospital por un cuadro de astenia, anorexia, pérdida de peso, sudoración nocturna, tos con escasa expectoración y febrícula de dos meses de evolución. La radiografía de tórax mostró un discreto infiltrado no cavitado en el lóbulo superior izquierdo y la reacción de Mantoux con PPD fue positiva. Se tomaron tres muestras consecutivas de esputo y se remitieron al laboratorio de Microbiología. Las tinciones para micobacterias fueron negativas, pero a los 32 días, se observó el crecimiento en el medio de Löwenstein-Jensen de unas colonias de bacilos ácido-alcohol resistentes (con la tinción de Ziehl-Neelsen) que fueron el motivo del control. Se solicitó a los participantes que llevaran a cabo 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. bovis* 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. bovis* según el laboratorio que actuó de referencia^a.

Característica / Prueba bioquímica	Resultado
Crecimiento lento (>7 días)	+
Crecimiento óptimo a 37°C	+
Fotocromogenicidad	-
Colonias lisas (S) o rugosas (R)	S/R^b
Reducción de nitratos	-
Niacina	-
Ureasa	-
Catalasa >45mm a 22°C	+/-
Catalasa >45mm a 68°C	-
Resistencia a la pirazinamida	+^c
Resistencia al TCH^d (5µg/ml)	-
Resistencia a la cicloserina	-

^aEn negrita, las pruebas clave.

^bColonias rugosas finas.

^cNegativa en la subespecie *caprae*.

^dHidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico.

Se recibieron 75 hojas de respuesta de los 93 cuestionarios enviados (80,6%), pero son 74 los centros que aportan resultados valorables, puesto que uno de ellos no comunica la identificación de la cepa (la envía a un laboratorio de referencia). Así, el porcentaje de participación real fue del 79,6%. Todos los laboratorios que llevaron a cabo la identificación de la cepa, la encuadraron correctamente dentro del grupo de las micobacterias, y como puede observarse en la tabla 2, el nivel de acierto es elevado, si consideramos que el 48,6% de los participantes clasifica la micobacteria dentro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, respuesta considerada como aceptable por parte del Programa de Control de Calidad. Además, un numero considerable de laboratorios (18,9%) la identifica como *M. bovis*, que es la respuesta considerada como óptima por el Programa, de acuerdo con los datos del laboratorio de referencia.

Tabla 2. Resultados de la identificación de la cepa.

Identificación	Número	%
Complejo <i>M. tuberculosis</i>	36	48,6
<i>M. tuberculosis</i>	21	28,4
<i>M. bovis</i>	14	18,9
<i>Mycobacterium africanum</i>	2	2,7
<i>M. bovis-africanum</i>	1	1,4
Total	74	100,0

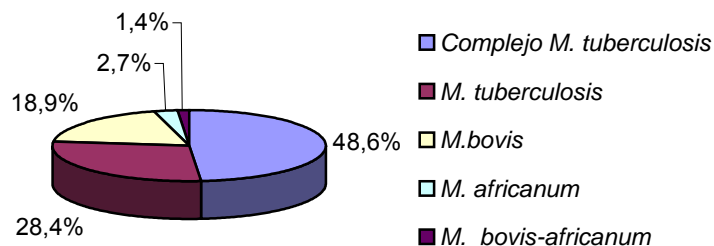


Figura 1. Porcentajes de identificación.

En cuanto al resto de laboratorios, como puede observarse en la figura 1, aportan distintos resultados: un 28,4% de los participantes la identifica como *M. tuberculosis* a nivel de especie, respuesta que no puede ser

considerada válida en este control (aunque se acepte a efectos de comparación de resultados en las pruebas de sensibilidad). Finalmente dos centros (2,7%) identificaron la cepa como *M. africanum* y un último participante no llega a distinguir entre *M. africanum* y *M. bovis*, respuestas que tampoco fueron consideradas como válidas por el Control de Calidad.

De los 74 laboratorios que llevaron a cabo la identificación, tan sólo dos centros (2,7%) no mencionan el método utilizado y ambos identificaron correctamente la cepa como perteneciente al complejo *M. tuberculosis*. Las sondas de ácidos nucleicos comerciales constituyen el método empleado mayoritariamente por los participantes. En total, 63 de los 74 laboratorios (85,14%) hacen uso de esta tecnología, en 42 ocasiones (56,7%) como método único de identificación y en 14 (18,9%) acompañadas por pruebas bioquímicas convencionales. Éstas fueron utilizadas por un total de 24 participantes, cinco de ellos sin auxilio de otros métodos (tabla 3).

Tabla 3. Métodos utilizados para la identificación.

Identificación	Número	%
Sonda	42	56,7
Pruebas bioquímicas + sonda	14	18,9
Pruebas bioquímicas	5	6,7
Pruebas bioquímicas + métodos moleculares	3	4,0
Hibridación inversa	3	4,0
No informa	2	2,7
Sonda + PCR-RFLP	1	1,4
Sonda + características morfo-culturales	1	1,4
Sonda + hibridación inversa	1	1,4
Pruebas bioquímicas + sonda + PCR-RFLP	1	1,4
Pruebas bioquímicas + sonda + genotipado	1	1,4
Total	74	100,0

No es posible obtener una conclusión firme en cuanto a la relación entre el método empleado y el porcentaje de acierto en la identificación de la cepa, dada la variabilidad de resultados, aunque es cierto que los laboratorios que utilizaron pruebas bioquímicas (solas o en combinación con métodos moleculares) tuvieron mayor capacidad para llegar a la identificación de especie. Así ocurrió en 11 de 14 participantes (78,6%) cuya identificación fue *M. bovis*, en ocho de ellos junto con diversos formatos comerciales de hibridación de ácidos nucleicos. Los métodos moleculares más concluyentes para la identificación de especie fueron minoritarios (tres de los 14) y siempre acompañando a otras metodologías.

Por otra parte, es interesante analizar los resultados referidos por los participantes que utilizaron como técnica única la hibridación con sondas comerciales que, como es sabido, no permite diferenciar las distintas especies incluidas en el complejo *M. tuberculosis*. En 24 de las 42 ocasiones, la identificación fue coherente (complejo *M. tuberculosis*), pero en las restantes 18 se identifica concretamente una de las especies comprendidas en dicho complejo, mayoritariamente *M. tuberculosis* (16 laboratorios). Curiosamente, un participante cuya identificación fue *M. bovis* refirió utilizar sólo sondas para la identificación, lo que resulta claramente insuficiente.

En cuanto a las marcas comerciales empleadas, existe lógicamente una correlación porcentual con las técnicas utilizadas en la identificación de la cepa. En primer lugar, y como en controles pasados, llama la atención el elevado número de participantes que no aportan información a este respecto (32,4%). Un número pequeño de centros (5,3%) no indica una marca establecida, correspondiéndose, en este caso, con los que emplean pruebas bioquímicas clásicas y manuales. Como se puede observar en la tabla 4, son 39 laboratorios de los 61 que dicen emplear una sonda de ácidos nucleicos en la identificación los que informan la marca: Accuprobe®/Gen-Probe. Como ya se ha adelantado en un párrafo anterior, cabe señalar que la gran mayoría de participantes que informaron la cepa como *M. tuberculosis* emplearon una sonda comercial, lo que hace pensar que el resultado de la misma no fue contrastado por los usuarios ya que, como se ha dicho, solo permiten encuadrar la cepa dentro del complejo tuberculoso.

Tabla 4. Marcas comerciales utilizadas para la identificación.

Marcas comerciales	Número	%
Accuprobe®/Genprobe (bioMérieux)	37	50,0
No informa	24	32,4
Manual	4	5,3
InnoLipa® (Innogenetics)	3	4,0
Accuprobe® (bioMérieux) + InnoLipa (Innogenetics)	2	2,7
Otras	4	5,3
Total	74	100,0

El estudio de sensibilidad a los antibióticos fue realizado por 53 de los 74 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa (71,6%). De ellos, tres participantes (5,7%) no aportaron datos sobre el método ni marca comercial empleados: todos ellos utilizaron los servicios de un laboratorio externo. De los que sí informan acerca de la técnica usada en la realización del antibiograma, cabe destacar los 41 centros (77,3%) que informan un método de dilución en medio líquido y que, en todos los casos, se corresponde con equipos comerciales automatizados. En segundo lugar pero con mucha diferencia, destaca el método de las proporciones que fue empleado por cuatro participantes (7,5%) y en tercer lugar hay que mencionar los tres centros (5,7%) que emplearon las tiras de E-test®. Todos estos datos los podemos ver resumidos en la tabla 5.

Tabla 5. Métodos empleados en el estudio de sensibilidad.

Método	Número	%
Dilución en medio líquido	41	77,3
Método de las proporciones	4	7,5
E-test®	3	5,7
No informa	3	5,7
CMI	1	1,9
Hibridación reversa	1	1,9
Total	53	100,0

Cabe señalar, que hay un laboratorio que refiere haber empleado dos métodos de estudio de sensibilidad: el sistema automatizado MB/Bact y el método de las proporciones. En ambos casos los resultados fueron equivalentes y la cepa se consideró sensible a los antituberculosos clásicos. En cuanto a las marcas comerciales empleadas, y como se deduce de la tabla de métodos empleados para realizar el antibiograma, destacan, en primer lugar, los equipos comerciales automatizados de Becton-Dickinson, MGIT® 960 y Bactec®460, que son empleados por 30 participantes (56,6%). En segundo lugar cabe señalar otro método comercial de dilución en medio líquido, como es MB/Bact®, empleado por ocho participantes. Como se puede observar en la tabla 6, existe gran diversidad de marcas comerciales. Para simplificar ésta, algunas respuestas se han englobado en el apartado "Otras", si bien cabe presumir que algunas de ellas correspondan a las metodologías mayoritarias, aspecto que no puede ser confirmado dada la ambigüedad o insuficiencia de la información aportada por estos participantes.

Tabla 6. Marcas comerciales empleadas en los estudios de sensibilidad.

Marca	Número	%
Bactec®MGIT 960 (Becton-Dickinson)	21	39,6
MB/Bact® (bioMeriéux)	9	17,0
Bactec® 460 TB (Becton-Dickinson)	7	13,2
Biomedics	3	5,7
ESP Culture System II	3	5,7
E-test® (AB Biodisk-Izasa)	2	3,8
Otras	4	7,5
No informa	4	7,5
Total	53	100,0

Por lo que respecta a los antibióticos estudiados, en contraposición con controles anteriores, no existe una gran variedad de fármacos estudiados, de forma que los centros participantes coinciden mayoritariamente con el laboratorio de referencia al probar básicamente los antituberculosos clásicos. Dicho laboratorio estableció que la cepa era sensible a isoniácida, rifampicina, etambutol y estreptomina y, obviamente, presentaba resistencia intrínseca a la pirazinamida. La rifampicina fue estudiada por el 96,2% de los 53 participantes; de los que 50 informan la cepa como sensible, coincidiendo con el laboratorio de referencia, con un intervalo de CMI de 0,003-2 µg/ml y un valor modal fue 1 µg/ml. Mayor discrepancia se aprecia con la sensibilidad a la isoniácida, que es probada por 52 participantes (98,1%). De ellos, 32 consideran la cepa sensible (valor modal de CMI, 0,1 µg/ml), coincidiendo con el centro de referencia, pero 19 la informan como resistente (36,5%). La estreptomina es estudiada por 49 centros (92,5%) y es informada como sensible por todos ellos, con CMI variable entre <=0,25 y 8 µg/ml y un valor modal de 1. El etambutol es informado por 51 laboratorios (96,2%), mostrándose la cepa sensible al mismo en 46 ocasiones, con un valor modal de 5 µg/ml. Finalmente, la pirazinamida es estudiada por 25 centros (47,2%), siendo resistente para 24 de ellos y sensible sólo para uno. Todos estos datos los vemos resumidos en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados de las pruebas de sensibilidad.

Antibiótico	Sensible	Resistente	No informa	Total
Isoniácida	32	19	1	52
Rifampicina	50	–	1	51
Etambutol	46	4	1	51
Estreptomina	49	–	–	49
Pirazinamida	1	24	–	25
PAS	2	–	–	2
Rifabutina	1	–	–	1
Lincosamidas	1	–	–	1
Etionamida	1	–	–	1

Los datos aportados por los participantes, permiten deducir que, de forma genérica, se obtuvo un perfil de sensibilidad a la isoniácida (en este caso los resultados son más variables), estreptomina, rifampicina y etambutol y de resistencia a la pirazinamida como cabría esperar y de modo coincidente con el laboratorio de referencia.

USO DEL LABORATORIO EXTERNO Y CAPACITACIÓN DE LOS LABORATORIOS PARTICIPANTES

De los 74 centros que llevan a cabo la identificación de la cepa, 61 (82,4%) afirman no haber utilizado un laboratorio de referencia, tres (4,1%) no informan sobre tal cuestión y diez centros (13,5%) indican que sí lo utilizan, siete de ellos (9,4%) de forma parcial. A la vista de los resultados obtenidos en el análisis de los datos, podemos concluir que la mayoría de los laboratorios que participan en el Control de Calidad disponen de los recursos técnicos adecuados para realizar un estudio, por lo menos preliminar, de las cepas de micobacterias que les lleve a su identificación. Es necesario resaltar aquí que llegar a la identificación de la especie *M. bovis* era un objetivo de muy buen nivel de calidad, siendo más que suficiente encuadrar la cepa dentro del complejo tuberculoso, dadas las circunstancias epidemiológicas de nuestro país. Aún así, una proporción no desdeñable (12 de los 72 participantes) alcanza la identificación óptima de forma incontrovertida (ausencia de discrepancia entre identificación y el método empleado). En sentido negativo, también hay que señalar los 21 participantes que identifican la cepa dentro de la especie *M. tuberculosis*, muchas de las veces utilizando métodos de identificación que no permiten hacer una distinción de las especies del complejo. De hecho, el objetivo de formación continuada que perseguía este control era poner en evidencia las limitaciones de los métodos, las cuales pueden ser más relevantes en el futuro dado el impacto creciente sobre nuestro sistema de salud de la inmigración de personas procedentes de áreas en donde *M. bovis* tiene una relevancia sanitaria destacada.

COMENTARIOS

Un total de 28 centros (37,8%) de los 74 que remiten hoja de respuesta con resultados valorables, 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 dos centros que realizan algún comentario. Uno de ellos, sugiere la importancia de este tipo de cuadros en pacientes procedentes de zonas con alta incidencia de TBC pulmonar y el otro remarca la importancia de realizar un estudio de sensibilidad por la procedencia del paciente (dada la alta prevalencia de resistencias). En cuanto al tratamiento, son seis los centros que comentan algo al respecto; tres de ellos mencionan la resistencia primaria que presenta *M. bovis* a la pirazinamida y la necesidad transmitir esta información al clínico responsable del paciente. Otros dos participantes recomiendan la pauta a seguir; uno opta por un régimen con isoniacida, rifampicina y etambutol durante tres meses y luego isoniacida y rifampicina durante seis-siete meses más y el otro recomienda combinar isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol o estreptomina hasta tener el resultado del antibiograma. Finalmente un centro apunta la necesidad de confirmar la resistencia a la isoniacida y, si es así, la necesidad de probar la pirazinamida.

Por lo que respecta a las identificaciones, tres participantes apuntan en sus comentarios un probable *M. bovis*, y otros tres un posible *M. africanum*. Todos ellos informan correctamente la cepa como perteneciente al complejo de *M. tuberculosis*. Un centro explica que la sonda empleada no diferencia entre las distintas especies del complejo y otro participante indica la necesidad de realizar pruebas genotípicas para distinguir entre *M. bovis* y *M. africanum*. En cuanto a otro tipo de consideraciones, son cuatro los centros que explican que no realizan estudio de sensibilidad por falta de tiempo y cuatro los que comentan que no realizan antibiograma en su laboratorio. Un centro comenta la necesidad de confirmar la identificación y antibiograma, enviando la cepa a un centro de referencia. El resto de comentarios hacen referencia a cuestiones técnicas secundarias en las que no vale la pena incidir.