

## CONTROL DE CALIDAD DE MICOBACTERIAS (MB-1/04)

En el presente control se envió a los distintos laboratorios participantes una cepa de *Mycobacterium gastri* en medio de Löwestein-Jensen. Había sido aislada de una paciente de 28 años de edad que se encontraba en diálisis peritoneal continua ambulatoria desde hacía un año por una insuficiencia renal crónica. Acudió al hospital por un cuadro de dolor abdominal persistente de una semana de evolución. Se encontraba afebril y, en la exploración física, se observó una discreta distensión abdominal con un líquido de drenaje claro y un orificio de salida del catéter normal. El análisis del líquido de diálisis mostró un aumento en el número de linfocitos. Se obtuvieron muestras del líquido dializado para sus estudios bacteriológicos y fúngicos convencionales, que fueron negativos. Las tinciones para micobacterias fueron también negativas pero, a los 25 días crecieron, en el medio de Löwenstein-Jensen unas colonias de bacilos ácido-alcohol resistentes que fueron el motivo del presente control.

Se solicitó a los participantes que llevaran a cabo la **identificación** de esta cepa, de acuerdo con las posibilidades técnicas de cada laboratorio y, que realizaran en caso de ser procedente, las **pruebas de sensibilidad**, así como que formularan **comentarios breves** que considerasen oportunos.

La cepa fue identificada como *M. gastri* por el laboratorio que actuó de referencia mediante las características de la tabla 1. Dada la similitud con *Mycobacterium kansasii*, la identidad fue confirmada mediante secuenciación.

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

Característica / Prueba bioquímica	Resultado	Característica / Prueba bioquímica	Resultado
Crecimiento lento (>7 días)	+	Niacina	-
Crecimiento a 37°C	+	<b>Catalasa a 68°C</b>	-
Colonias lisas (S) o rugosas (R)	S/SR/R	Catalasa semicuantitativa (<45mm)	+
<b>Fotocromogenicidad</b>	-	Hidrólisis del Tween® 80	+
<b>Reducción de nitratos</b>	-	Tolerancia NaCl 5% (28°C)	-
Arisulfatasa (3 días)	-	Crecimiento en TH2 (10 µg/ml)	+
Pirazinamidasa (4 días)	-	Crecimiento en McConkey sin cristal violeta	-
<b>Ureasa</b>	±		

<sup>a</sup>En negrita, las pruebas clave, que ayudan a diferenciar *M. gastri* de *M. kansasii*.

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN

Se recibieron 71 hojas de respuesta de los 92 cuestionarios enviados, lo que supone un porcentaje de participación real del 77,2%, puesto que todos aportaron resultados valorables (identificación de la cepa). Como puede observarse en la tabla 2, todos los laboratorios encuadraron correctamente la cepa dentro del grupo de las micobacterias. Dado el nivel de dificultad, se alcanzó un porcentaje de acierto aceptable, si consideramos que el 47,9% de los participantes realizó la identificación correcta de especie, informándola como *M. gastri*. También cabe destacar el considerable porcentaje de participantes que identificó la cepa como *M. kansasii* (15,5%). Esto queda explicado si tenemos en cuenta lo cercanas que son ambas especies, incluso en sus características genotípicas y el hecho de que la técnica de hibridación inversa INNOLiPA las identifica en conjunto como *M. kansasii* grupo 3 (incluye *M. kansasii* III, IV, V, *M. gastri*). En cuanto al resto, aportan resultados muy diversos, algunos considerados aceptables por parte del Control, incluidos los que hacen una aproximación genérica. Sin embargo, en otras ocasiones, la identificación de especies informada se aparta de lo considerado como aceptable por parte del Programa.

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

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium gastri</i>	34	47,9
<i>Mycobacterium kansasii</i>	10	14,1
<i>Mycobacterium</i> (no <i>M. tuberculosis</i> )	6	8,5
Género <i>Mycobacterium</i>	5	7,1
Micobacteria atípica	2	2,8
Complejo <i>M. fortuitum/chelonae</i>	2	2,8
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	2	2,8
Micobacteria no cromógena de crecimiento lento	2	2,8
<i>Mycobacterium avium</i> complex	1	1,4
Micobacteria de crecimiento rápido	1	1,4
<i>Mycobacterium genavense</i>	1	1,4
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	1	1,4
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1	1,4
<i>Mycobacterium triviale</i>	1	1,4
<i>Mycobacterium xenopi</i>	1	1,4
<i>Mycobacterium kansasii</i> grupo 3	1	1,4
Total	71	100,0

En cuanto a los métodos utilizados para la identificación, de los 71 centros que enviaron hoja de respuesta, fueron ocho los participantes (11,3%) que no aportaron información al respecto; cinco de ellos identificaron la cepa como *M. gastris* y afirmaron haber recurrido a un laboratorio externo de referencia, mientras que los otros tres llevaron a cabo una identificación genérica. El método mayoritariamente empleado fue la utilización de pruebas bioquímicas, usadas como única técnica de identificación por 14 participantes (19,7%), mientras que 24 centros (33,8%) la utilizaron en combinación con métodos moleculares (sonda, hibridación inversa, secuenciación, etc.) y siete (9,9%) teniendo en cuenta las características morfo-culturales.

Las sondas de ácidos nucleicos comerciales fueron empleadas por 16 laboratorios (22,5%); en ocho de ellos (11,3%) de forma aislada, en cinco centros junto a las pruebas bioquímicas clásicas (7,0%) y en uno (1,4%) junto con técnicas de hibridación inversa; además, hubo dos laboratorios (2,8%) que combinaron las sondas con pruebas bioquímicas y de hibridación inversa. En tercer lugar, cabe destacar las pruebas de hibridación inversa y otros métodos moleculares. En cualquier caso, no se puede decir que exista una correlación definitiva entre el tipo de método empleado y la identificación correcta de la cepa, aunque parece que el porcentaje de acierto en la identificación fue mayor cuando las técnicas básicas (bioquímica, características morfológicas y culturales) se usaron como complemento de métodos moleculares específicos, pues la especie que nos ocupa presentaba una cierta dificultad, ya que la sonda de DNA de Gen-Probe era negativa (resultado aportado por el laboratorio de referencia) a pesar de su cercanía con *M. kansasii* (lo que puede objetivarse al hacer la secuenciación). Los datos correspondientes al método empleado en la identificación quedan reflejados en la tabla 3.

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

Identificación	Número	%
Pruebas bioquímicas	14	19,7
Sonda	8	11,3
No informa	8	11,3
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa	8	11,3
Pruebas bioquímicas + características morfo-culturales	7	9,9
Pruebas bioquímicas + sonda	5	7,0
Pruebas bioquímicas + PCR-RFLP	5	7,0
Hibridación inversa	4	5,7
Pruebas bioquímicas + PCR-RFLP + secuenciación	2	2,8
Pruebas bioquímicas + sonda + hibridación	2	2,8
Pruebas bioquímicas + métodos moleculares	1	1,4
Pruebas bioquímicas + PCR-RFLP + cromatografía	1	1,4
Características morfo-culturales	1	1,4
Genotipado	1	1,4
Métodos moleculares	1	1,4
Secuenciación	1	1,4
Sonda + hibridación inversa	1	1,4
Tinción de Ziehl-Neelsen	1	1,4
Total	71	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. Llama la atención el elevado número de participantes que no aportan información a este respecto (42,3%) y que podría corresponderse en parte con aquellos centros que emplean métodos moleculares no comerciales. Por otro lado, también un número considerable de laboratorios (32,4%) no aporta marca establecida, correspondiéndose, en este caso, con los que emplean técnicas manuales. Como se puede observar en la tabla 4, tan sólo son cinco centros (31,3%) de los 16 laboratorios que dicen emplear una sonda de ácidos nucleicos en la identificación de la cepa, los que informan la marca Accuprobe®/Gen-Probe. Por otro lado, los 15 participantes que informan la hibridación inversa como método indican que el equipo comercial es el de INNOLiPA® (Innogenetics).

**Tabla 4. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.**

Equipo comercial	Número	%
No informa	30	42,3
Manual	23	32,4
INNOLiPA (Innogenetics)	13	18,3
Accu-probe/Gen-probe (bioMérieux)	3	4,2
Gen-probe (bioMérieux) + INNOLiPA	2	2,8
Total	71	100,0

## RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS

El estudio de sensibilidad a los antibióticos fue realizado por 24 (33,8%) de los 71 centros que identificaron la cepa. De ellos, tres participantes (12,5%) no aportaron datos sobre el método ni marca comercial empleados. De los que sí informaron acerca de la técnica usada en la realización del antibiograma, cabe destacar los 10 centros (41,6%) que emplearon un método de dilución en medio líquido que, en todos los casos, se llevó a cabo con equipos comerciales automatizados. En segundo lugar, destacan las tiras de E-test,® que fueron empleadas por cinco

participantes (20,8%) y en tercer lugar hay que mencionar los cuatro centros (16,7%) 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 según el antibiótico probado: tiras E-test® y disco-placa.

**Tabla 5. Métodos empleados en los estudios de sensibilidad.**

Método	Número	%
Dilución en medio líquido	10	41,6
E-test®	5	20,8
Método de las proporciones	4	16,7
Disco-placa	1	4,2
Disco-placa + E-test®	1	4,2
No informa	3	12,5
Total	24	100,0

En cuanto a las marcas comerciales empleadas, y como se deduce del análisis de métodos, destacan en primer lugar los equipos comerciales automatizados de Becton-Dickinson, MGIT® 960 y Bactec®460, que son utilizados por seis participantes (25,0%). Otros métodos comerciales de dilución en medio líquido, como ESP® Culture System (Trek) y MB/Bact® son empleados por tres laboratorios. Como se puede observar en la tabla 6, no se aportan otros datos especialmente interesantes, aunque cabe destacar que un porcentaje elevado de centros (25,0%) no informó de la marca comercial empleada.

**Tabla 6. Marcas comerciales empleadas en el estudio de sensibilidad.**

Marca	Número	%
Bactec®MGIT 960 (Becton-Dickinson)	4	16,7
ESP® Culture System II (Trek)	3	12,5
Izasa	3	12,5
AB Biodisk	2	8,3
Bactec® 460 TB (Becton-Dickinson)	2	8,3
Biomedics	2	8,3
bioMérieux	1	4,2
MB/Bact® (bioMérieux)	1	4,2
No informa	6	25,0
Total	24	100,0

Por lo que respecta a los antibióticos estudiados, en la tabla 7 se muestra los resultados de sensibilidad para los tuberculostáticos de primera línea, aportados por el laboratorio que actuó como centro de referencia, según el cual, la cepa era sensible a rifampicina, isoniacida, etambutol y estreptomina pero resistente a pirazinamida.

**Tabla 7. Sensibilidad de la cepa según el laboratorio de referencia.**

Antibiótico	Interpretación	CMI
Rifampicina	S	1
Isoniacida	S	1
Etambutol	S	5
Estreptomina	S	6
Pirazinamida	R	100

Entre los datos aportados por los participantes, destaca la amplia variedad de antibióticos estudiados, lo que en parte se puede explicar por la falta de un criterio claro a la hora de elegir los fármacos ideales, como ocurre con otras micobacterias atípicas, máxime cuando la patogenicidad de la cepa objeto del estudio ha sido escasamente documentada. De hecho, y como se detallará más adelante, son varios los participantes que en sus comentarios remarcan que no procede en este caso la realización de antibiograma. De todos modos, son los tuberculostáticos clásicos, junto con la claritromicina, amikacina, ácido paraaminosalicílico y ciprofloxacino, las drogas mayoritariamente ensayadas.

La rifampicina es estudiada por 23 (95,8%) de los 24 participantes que realizaron estudio de sensibilidad; de ellos 22 (95,7%) informaron la cepa sensible, coincidiendo con el laboratorio de referencia y tan sólo un centro emitió un resultado discrepante. Sin embargo, con la isoniacida se obtuvieron resultados dispares, si se tiene en cuenta que, de los 22 centros que la estudiaron esta droga, sólo seis (27,3%) aportaron un resultado coincidente con el laboratorio de referencia.

La sensibilidad al etambutol y a la estreptomina fue estudiada por 21 y 20 participantes, respectivamente, obteniéndose resultados mayoritariamente coincidentes con el de referencia, del mismo modo que ocurrió con la pirazinamida que fue estudiada por diez centros. El resto de los datos quedan reflejados en la tabla 8.

**Tabla 8. Distribución de los resultados de sensibilidad.**

Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio	Total
Rifampicina	22	1	–	23
Isoniacida	6	16	–	22
Etambutol	18	2	1	21
Estreptomina	17	3	–	20
Pirazinamida	1	9	–	10
Etionamida	8	–	–	8
Claritromicina	5	–	1	6
PAS	3	2	–	5
Amikacina	5	–	–	5
Ciprofloxacino	4	1	–	5
Levofloxacino	4	–	–	4
Linezolid	3	–	–	3
Cotrimoxazol	3	–	–	3
Cicloserina	3	–	–	3
Imipenem	2	1	–	3
Lincosamidas	3	–	–	3
Cefoxitina	2	–	–	2
Eritromicina	1	1	–	2
Kanamicina	2	–	–	2
Ofloxacino	2	–	–	2
Moxifloxacino	1	–	–	1
Capreomicina	1	–	–	1
Doxiciclina	1	–	–	1
Tobramicina	1	–	–	1
Azitromicina	1	–	–	1

## USO DE LABORATORIO EXTERNO

De los 71 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 51 (71,8%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, cinco (7,0%) no informaron sobre tal cuestión y 15 centros (21,1%) indicaron que sí lo habían utilizado, siete de ellos (9,9%) 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 necesarios para realizar un estudio, por lo menos preliminar de las cepas demicobacterias.

Es necesario resaltar aquí que llegar a la identificación de la especie *M. gastri* era un objetivo de alto nivel de calidad, dado la rareza del aislamiento, la controvertida patogenidad de la especie (con sólo tres casos claramente documentados) y la dificultad de su diferenciación con especies más frecuentes como *M. kansasii* y *M. malmoense*. Aún así, un porcentaje considerable de participantes (47,9%) consiguió la identificación óptima.

## COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

Un total de 39 centros (54,9%) hacen algún comentario sobre la cepa remitida por el Control de Calidad, su tratamiento o aspectos clínicos del caso. Una buena parte de ellos tiene que ver con la significación clínica de la micobacteria remitida. Así, hay cuatros centros que afirman que se trata de una micobacteria no patógena habitualmente, un laboratorio comenta que produce manifestaciones clínicas en inmunodeprimidos, dos informan que se trata de una micobacteria que puede producir peritonitis en pacientes sometidos a diálisis peritoneal y un participante comenta que son necesarios varios aislamientos repetidos para considerar a la cepa como causante del cuadro clínico. Un laboratorio, que no llega al nivel de especie, afirma que esto es necesario para conocer el significado clínico de la muestra y finalmente, hay un participante que señala que las manifestaciones clínicas orientarían hacia *M. kansasii* aún cuando la identificación de laboratorio es de *M. gastri*.

En cuanto al tratamiento, son dos los centros que comentan algo al respecto; coinciden en recomendar una terapia combinada, que incluye rifampicina y etambutol, según uno de ellos, y rifampicina, etambutol e isoniacida durante un año, según el otro.

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, y cuatro los que comentan que no lo realizan pues no existe un antibiograma normalizado. Además, un participante aludió a la falta de tiempo para realizar el estudio de sensibilidad. Finalmente cabe comentar que tres participantes informaron que, en el caso de que se tratara de una muestra real remitida a su laboratorio, se enviaría al laboratorio de referencia para que se realizara el estudio de sensibilidad y seis participantes lo harían para obtener una identificación definitiva o para su confirmación. Desde el Control de Calidad se insiste en la conveniencia de que se realicen todos los pasos que se seguirían con una muestra convencional, con el fin de que el análisis de los datos aportados por los participantes se ajuste lo máximo posible a la realidad.