

## CONTROL DE CALIDAD DE MICOBACTERIAS (MB-2/04)

En el presente control se envió a los distintos laboratorios participantes una cepa de *Mycobacterium intracellulare* en medio de Löwestein-Jensen. Había sido aislada de un paciente varón de 29 años de edad, seropositivo para el VIH y usuario de drogas por vía parenteral, que acudió a Urgencias por presentar un cuadro de fiebre (38°C), sudoración nocturna, diarrea, dolor abdominal y pérdida de peso (5 kg) de dos semanas de evolución. En la exploración física se observó un paciente febril, con signos de desorientación temporo-espacial, estertores y subcrepitantes pulmonares y ligera hepatoesplenomegalia. La cifra de linfocitos CD4 era, en esos momentos, de 80 células/mm<sup>3</sup>.

Se recogieron muestras de esputo y de heces y se enviaron al laboratorio de Microbiología para cultivo bacteriológico y estudio de micobacterias. En ambos casos el cultivo bacteriológico fue negativo, pero en el medio de Löwestein-Jensen crecieron unas colonias de bacilos ácido-alcohol resistentes que fueron el motivo del presente control.

Se solicitó a los participantes que llevaran a cabo el procesamiento e **identificación** de la cepa y, caso de ser procedente, las **pruebas de sensibilidad**, así como que formularan los **comentarios y sugerencias que considerasen oportunos**.

La cepa fue identificada como *M. intracellulare* por el laboratorio que actuó de referencia mediante las características bioquímicas de la tabla 1 y el empleo de sondas de ácidos nucleicos específicas.

**Tabla 1. Pruebas bioquímicas realizadas por el laboratorio que actuó de referencia.**

Característica / Prueba bioquímica	Resultado	Característica / Prueba bioquímica	Resultado
Crecimiento lento (>7 días)	+	Niacina	-
Crecimiento a 37°C	+	Catalasa a 68°C	+/-
Colonias lisas (S) o rugosas (R)	S/R	Catalasa semicuantitativa (<45mm)	98%
Fotocromogenicidad	-	Hidrólisis del Tween® 80	-
Reducción de nitratos	-	Tolerancia al NaCl 5% (28°C)	-
Ariilsulfatasa (3 días)	-	Crecimiento en TH2 (10 µg/ml)	+
Pirazinamidasa (4 días)	+	Reducción del telurito	+
Ureasa	-		

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN

Se recibieron 74 hojas de respuesta de los 92 cuestionarios enviados, lo que supone un porcentaje de participación real del 80,4%, 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 aciertos aceptable, si consideramos que el 54,1% de los participantes realizó la identificación correcta de especie, informándola como *M. intracellulare* o *M. intracellulare* tipo I. También cabe destacar el considerable porcentaje de participantes que identificó la cepa como perteneciente al complejo *Mycobacterium avium* (39,2%) y los dos centros (2,7%) que informaron *M. avium*. Todas estas identificaciones fueron consideradas válidas por parte del Programa de Control de Calidad.

En cuanto al resto, dos laboratorios aportaron como resultado que se trataba de una micobacteria atípica y sólo un participante remitió un resultado de identificación discrepante, informando la cepa como perteneciente a la especie *Mycobacterium simiae*.

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

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	36	48,7
<i>Mycobacterium avium</i> (complejo)	29	39,2
<i>Mycobacterium intracellulare</i> tipo I	4	5,4
<i>Mycobacterium avium</i>	2	2,7
Micobacteria atípica	2	2,7
<i>Mycobacterium simiae</i>	1	1,3

Por lo que respecta a los métodos utilizados para la identificación, de los 74 centros que enviaron hoja de respuesta, fueron cinco los participantes (6,8%) que no aportaron información al respecto; dos de ellos identificaron la cepa como *M.intracellulare* y otros dos como *M.intracellulare* tipo I, habiendo recurrido a un laboratorio externo de referencia en todos los casos, mientras que el último centro informó una micobacteria atípica sin recurrir a un centro externo. El método mayoritariamente empleado fue la hibridación con sondas de ácidos nucleicos, usadas como única técnica de identificación por 40 participantes (54,1%); tres centros (4,1%) la utilizaron en combinación con pruebas bioquímicas, dos participantes (2,7%) en combinación con una técnica de hibridación inversa, uno (1,3%) junto a pruebas bioquímicas y métodos moleculares (PCR-RFLP), y otro (1,3%) teniendo en cuenta las características morfo-culturales. En segundo lugar, cabe destacar las pruebas de hibridación inversa, que fueron empleadas por 17 centros (23,0%), solas o en combinación con otros métodos moleculares o pruebas bioquímicas. En cualquier caso, parece existir una lógica correlación entre el tipo de método empleado y el nivel de identificación de la cepa, de modo que los centros que llegan al diagnóstico más preciso de especie es porque emplean técnicas de biología molecular. Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 3.

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

Identificación	Número	%
Sonda	40	54,1
Hibridación inversa	9	12,2
Pruebas bioquímicas	4	5,4
Pruebas bioquímicas + sonda	3	4,1
Hibridación	3	4,1
Hibridación inversa + PCR-RFLP	2	2,7
PCR-RFLP	2	2,7
Sonda + hibridación inversa	2	2,7
Pruebas bioquímicas + sonda + PCR -RFLP	1	1,3
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa + PCR -RFLP	1	1,3
Características morfo-culturales + tinción de Ziehl-Neelsen	1	1,3
Características morfo-culturales + sonda	1	1,3
No informa	5	6,8
Total	74	100,0

Por lo que respecta a las marcas comerciales empleadas, existe 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 (33,8%), y que podría corresponderse en parte con aquellos centros que emplean métodos moleculares no comerciales. Por otro lado, un pequeño número de laboratorios (8,1%) no aporta marca establecida, correspondiéndose, en este caso, con los que emplean técnicas manuales. Como se puede observar en la tabla 4, de los 47 centros que dicen emplear una sonda de ácidos nucleicos en la identificación de la cepa, son 32 (68,1%) los que informan la marca Accuprobe®/Gen-Probe. Por otro lado, de los 14 participantes que informan la hibridación inversa como método, tan sólo uno no informa marca, y el resto indica que el equipo comercial es el de InnoLiPA® (Innogenetics).

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

Equipo comercial	Número	%
Accu-probe/Gen-probe® (bioMérieux)	30	40,5
No informa	25	33,8
InnoLiPA® (Innogenetics)	11	14,9
Manual	6	8,1
Gen-probe® (bioMérieux) + InnoLiPA®	2	2,7
Total	74	100,0

## RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS

El estudio de sensibilidad a los antibióticos fue realizado por 26 (35,1%) de los 74 centros que enviaron hoja de respuesta con resultados valorables. De ellos, cinco participantes (19,2%) no aportaron datos sobre el método empleado. Del resto cabe destacar, en primer lugar, los ocho centros (30,8%) que emplearon las tiras de E-test® para la realización del antibiograma y, en segundo, los que emplearon una técnica de dilución en medio líquido (26,9%), o un método de proporciones (23,1%), que en la mayoría de los casos se llevó a cabo con equipos comerciales automatizados. Todos estos datos están resumidos en la tabla 5.

Cabe señalar, que hay tres laboratorios que refieren haber empleado dos métodos para el estudio de sensibilidad, dependiendo del fármaco probado: uno combina el método de las proporciones con disco-placa, otro con dilución en medio líquido automatizado y, el último, tiras E-test® y método de las proporciones.

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

Método	Número	%
E-test®	8	30,8
Dilución en medio líquido	7	26,9
Método de las proporciones	6	23,1
No informa	5	19,2
Total	26	100,0

En cuanto a los equipos comerciales empleados, un porcentaje muy elevado de centros (42,3%) no informó de la marca comercial empleada. Como se deduce del análisis de métodos, destacan los equipos comerciales automatizados de Becton-Dickinson, que son utilizados por seis participantes (23,1%), y en segundo lugar los productos de AB Biodisk para la realización de E-test®. Otros métodos comerciales de dilución en medio líquido, como ESP® Culture System (Trek) MB/Bact® son empleados por dos laboratorios. El conjunto de datos queda reflejado en la tabla 6.

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

Marca	Número	%
No informa	11	42,3
Bactec®MGIT 960 (Becton-Dickinson)	4	15,3
AB Biodisk	3	11,5
bioMérieux	2	7,7
ESP® Culture System II (Trek)	2	7,7
Izasa	1	3,9
Bactec® 460 TB (Becton-Dickinson)	1	3,9
Bactec® sin especificar (Becton-Dickinson)	1	3,9
Bact Alert	1	3,9
Total	26	100,0

Por lo que respecta a los antibióticos estudiados, en la tabla 7 se muestran los resultados de sensibilidad aportados por el laboratorio que actuó como centro de referencia. Según el NCCLS, no hay recomendación sobre un antibiograma estándar para el complejo *M. avium*, indicando tan sólo que se debe estudiar la sensibilidad a los macrólidos (claritromicina y azitromicina); de hecho, existen estudios con el etambutol, rifampicina y clofacimina que no demuestran correlación entre los resultados *in vitro* y respuesta clínica. A pesar de ello, se ha considerado oportuno aportar unos datos que sirvan de referencia a los laboratorios que realizaron dicho estudio de sensibilidad.

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

Antibiótico	Interpretación	CMI (µg/mL)
Rifampicina	S	1,0
Isoniacida	R	0,1
Etambutol	S	5,0
Estreptomina	R	1,0
Claritromicina	S	=0,125
Azitromicina	S	=0,125
Ciprofloxacino	S	0,25
Moxifloxacino	S	0,06
Linezolida	S	0,5

Entre los datos aportados por los participantes (tabla 8), destaca la variedad de fármacos estudiados, lo que contrasta con aquéllos que, en sus comentarios, remarcan que no procede en este caso la realización del antibiograma, por no estar estandarizado. De todos modos, son los tuberculostáticos clásicos, junto con la claritromicina, amikacina y quinolonas en general, las drogas mayoritariamente ensayadas. La rifampicina es estudiada por 21 (80,8%) de los 26 participantes que realizaron estudio de sensibilidad; de ellos 16 (76,2%) informaron la cepa sensible, coincidiendo con el laboratorio de referencia, uno (4,8%) intermedia y cuatro centros (19,0%) emitieron un resultado discrepante. Sin embargo, con la isoniacida, prácticamente todos obtuvieron resultados coincidentes con el laboratorio de referencia. La sensibilidad al etambutol y a la estreptomina refleja resultados variables y a la vez discrepantes, en un número considerable, con el laboratorio de referencia.

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

Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio	Total
Rifampicina	16	4	1	21
Etambutol	13	8	-	21
Isoniacida	1	17	-	18
Estreptomina	4	11	1	16
Claritromicina	14	-	-	14
Ofloxacino	1	5	-	6
Etionamida	6	-	-	6
Amikacina	4	2	-	6
Pirazinamida	1	4	-	5
Rifabutina	3	1	-	4
Ciprofloxacino	1	3	-	4
PAS	-	3	-	3
Azitromicina	2	1	-	3
Capreomicina	-	2	-	2
Cicloserina	2	-	-	2
Kanamicina	2	-	-	2
Lincosamidas	2	-	-	2
Moxifloxacino	2	-	-	2
Rifapentina	-	1	-	1

## USO DE LABORATORIO EXTERNO

De los 74 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 60 (81,1%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, dos (2,7%) no aportaron información sobre este dato y doce centros (16,2%) indicaron que sí lo habían utilizado, seis de ellos (8,1%) de forma parcial. Por lo tanto, a la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que una gran parte de los laboratorios que participan en el Programa de Control de Calidad disponen de los recursos técnicos necesarios para realizar de forma óptima un estudio bastante completo de micobacterias.

## COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

Un total de 27 centros (36,5%) hace algún comentario sobre la cepa remitida, su tratamiento o aspectos clínicos del caso clínico que la acompañaba. Una buena parte de ellos, tiene que ver con la conveniencia o no de realizar las pruebas de sensibilidad: cinco centros afirman que no existe un antibiograma estandarizado o que no está indicado por el NCCLS, cuatro laboratorios señalan que no se realiza estudio de sensibilidad frente a este microorganismo, dos que no hay correlación con la respuesta terapéutica, y tres participantes informan que el NCCLS recomienda que sólo se estudie la sensibilidad a la claritromicina.

En cuanto al tratamiento, son varios los centros que comentan algo al respecto; uno recomienda terapia empírica y el resto da indicaciones precisas de los fármacos que se deben administrar, de modo que cuatro centros sugieren la combinación de claritromicina, etambutol y rifampicina/rifabutina, un laboratorio rifampicina, etambutol e isoniacida y otro centro rifampicina, etambutol y azitromicina. Por lo que respecta a aspectos clínicos, sólo dos participantes afirman que se trata de una infección asociada al SIDA y a bajos recuentos de CD4. Finalmente, dos centros indican que si se tratara de un aislamiento clínico o muestra real remitida a su laboratorio, se enviaría al laboratorio de referencia para que se completara la identificación y/o se realizara el estudio de sensibilidad. De nuevo, 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. Todos los comentarios quedan resumidos en la tabla 9.

**Tabla 9. Comentarios realizados por los participantes.**

<b>Comentarios</b>	<b>Número</b>
No existe un antibiograma estandarizado para esta micobacteria	5
No se debe hacer antibiograma frente a este microorganismo	4
Según el NCCLS, sólo se informa la sensibilidad a la claritromicina	3
No existe correlación de las pruebas <i>in vitro</i> con la respuesta clínica	2
Si se trata de un aislamiento clínico, se envía a centro de referencia	2
El antibiograma en MGIT invalidado	1
Recomendaciones sobre el tratamiento	6
Rifampicina+etambutol+isoniacida	1
Rifampicina/rifabutina+etambutol+claritromicina/azitromicina	5
Infección asociada a SIDA y bajo recuento de CD4	2
Se recomienda tratamiento empírico	1
Probable <i>Mycobacterium gastri</i>	1
Identificación: complejo <i>M. avium</i> o <i>Mycobacterium xenopi</i>	1