

CONTROL DE CALIDAD DE MICOBACTERIAS (MB-1/05)

En el presente control, se envió a los participantes una cepa de *Mycobacterium smegmatis* en medio de Löwestein-Jensen. Había sido aislada de un paciente varón de 17 años de edad, en diálisis peritoneal continua ambulatoria desde hacía tres años que acudió a urgencias por presentar un cuadro de dolor abdominal y fiebre de varios días de evolución. El líquido peritoneal presentaba un recuento celular elevado (760 cel/ μ L), pero la tinción de Gram y los cultivos bacteriológicos convencionales fueron negativos. El paciente recibió de forma empírica vancomicina intravenosa y cefuroxima intraperitoneal, con resolución de los síntomas. Sin embargo, a los cuatro días, reapareció la sintomatología, con fiebre elevada de hasta 38,5°C, malestar general, dolor abdominal persistente, vómitos y disminución de los ruidos intestinales. Se remitió una nueva muestra de líquido peritoneal al Laboratorio de Microbiología para la realización del examen microscópico de la muestra, cultivo bacteriológico convencional y cultivo de micobacterias. La tinción de Gram fue negativa, pero en la tinción de Ziehl-Neelsen se observaron escasos bacilos ácido-alcohol resistentes. Se obtuvo crecimiento de unas colonias a las 48 h de incubación en agar chocolate y, mientras se procedía a la identificación de éstas, creció en el medio de Löwestein-Jensen la micobacteria que es objeto del presente control.

Se solicitó a los laboratorios participantes la **identificación** de la micobacteria/s implicada/s en este cuadro clínico y si procede, el estudio de sensibilidad, así como formular los **comentarios** que se considerasen oportunos. La cepa fue identificada como *M. smegmatis* por el laboratorio que actuó de referencia mediante las características bioquímicas (tabla 1) y métodos moleculares (técnica de hibridación inversa y secuenciación).

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

Característica / Prueba bioquímica	Resultado	Característica / Prueba bioquímica	Resultado
Crecimiento rápido (<7 días)	+	Catalasa semicuantitativa (>45mm)	+
Crecimiento óptimo a 28°C	+	Catalasa a 68°C	+
Colonias rugosas (R) o lisas (S)	R/S	Hidrólisis del Tween® 80	+
Fotocromogenicidad	-	Tolerancia al NaCl 5% (28°C)	+
Reducción de nitratos	+	Crecimiento en TH2 (10 μ g/ml)	+
Arilsulfatasa (3 días)	-	Reducción del telurito	+
Crecimiento en McConkey	-		

^aEn negrita, las pruebas clave, que diferencian *M. smegmatis* de otras micobacterias de crecimiento rápido, como *M. fortuitum* y *M. phlei*.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN

Se envió la cepa a un total de 93 participantes, de los que 78 (83,9%) remitieron hoja de respuesta. Una de ellas, no contenía resultados valorables (identificación de la cepa), e informaba de que estas pruebas no se realizan en su laboratorio, por lo que en realidad fueron 77 los centros que aportaron resultados analizables, siendo el porcentaje de participación real del 82,8%.

Como puede observarse en la tabla 2, no todos los laboratorios clasificaron la cepa como una micobacteria, ya que dos de ellos la informaron como perteneciente al género *Nocardia*; además, uno de los participantes tan sólo informó que se trataba de un bacilo ácido alcohol resistente. A pesar de ello, dado el nivel de dificultad del presente control para diferenciar esta especie de otras micobacterias de crecimiento rápido más habituales en la práctica diaria, se alcanzó un porcentaje de aciertos aceptable, si consideramos que el 58,4% de los participantes realizó la identificación correcta, informando la cepa como *M. smegmatis*; ésta fue la única respuesta considerada válida por parte del Programa de Control de Calidad, quedando aquí englobada la identificación aportada por el participante que informó *Mycobacterium goodii*, como perteneciente al grupo *M. smegmatis*.

Tabla 2. Resultados de la identificación de la cepa.

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	44	57,1
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	11	14,3
Género <i>Mycobacterium</i> (no <i>M. tuberculosis</i>)	6	7,8
<i>M. fortuitum</i> y <i>M. smegmatis</i>	2	2,6
Micobacteria atípica	2	2,6
Micobacteria de crecimiento rápido	2	2,6
<i>Mycobacterium chelonae</i>	2	2,6
<i>Mycobacterium goodii</i>	1	1,3
<i>Mycobacterium parafortuitum</i>	1	1,3
<i>Mycobacterium phlei</i>	1	1,3
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1	1,3
Género <i>Mycobacterium</i>	1	1,3
Bacilo ácido-alcohol resistente	1	1,3
<i>Nocardia asteroides</i>	1	1,3
Género <i>Nocardia</i>	1	1,3
Total	77	100,0

Cabe destacar que un porcentaje considerable de laboratorios (15,6%) identificó la cepa como *M. fortuitum*. La mayor parte de ellos, emplearon para la identificación pruebas bioquímicas convencionales, que les pudieron conducir a error, dada la gran similitud entre las dos especies (se diferencian fundamentalmente por la prueba de la arilsulfatasa y el crecimiento en McConkey). También es importante resaltar, los dos participantes que informaron la presencia de dos especies, *M. smegmatis* y *M. fortuitum*, empleando el mismo método y marca comercial, lo que hace pensar que se produjo un error en la interpretación de los resultados, pues la lectura de las tiras de hibridación inversa muestra un patrón de bandas para *M. smegmatis* que puede inducir a la confusión. En cuanto al resto, seis laboratorios (7,8%) aportaron como resultado que se trataba de una micobacteria no tuberculosa, cuatro centros (5,2%) de una micobacteria atípica o de crecimiento rápido, y uno tan sólo aportó la identificación genérica. Finalmente, tres participantes remitieron respuestas incorrectas, identificando distintas especies de crecimiento rápido.

Por lo que respecta a los métodos utilizados para la identificación, de los 77 centros que enviaron hoja de respuesta, fueron doce los participantes (15,6%) que no aportaron información al respecto, de los cuales siete centros recurrieron a un laboratorio externo de referencia. El método mayoritario fue la bioquímica convencional, usado como única técnica o en combinación con las características morfo-culturales por 25 participantes (32,4%); tres centros (3,9%) la utilizaron en combinación con métodos moleculares (PCR-RFLP) y un participante (1,3%) en combinación con una técnica de hibridación inversa.

En segundo lugar, cabe destacar las pruebas de hibridación inversa, que fueron empleadas por 17 centros (22,1%), solas o junto a otros métodos moleculares (PCR-RFLP, cromatografía) o pruebas bioquímicas. En cualquier caso, parece existir una 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, emplean técnicas de biología molecular (PCR-RFLP, hibridación, secuenciación), muchas veces combinados con pruebas bioquímicas convencionales. Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 3.

Tabla 3. Métodos utilizados para la identificación.

Método identificación	Número	%
Pruebas bioquímicas	16	20,7
Hibridación inversa	13	16,9
Pruebas bioquímicas + características morfo-culturales	9	11,7
Sonda	6	7,8
Pruebas bioquímicas + PCR-RFLP	3	3,9
Características morfo-culturales	3	3,9
PCR-RFLP	3	3,9
Secuenciación	3	3,9
Pruebas bioquímicas + métodos moleculares	2	2,6
Hibridación inversa + PCR-RFLP	2	2,6
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa	1	1,3
Cromatografía (HPLC)	1	1,3
Hibridación inversa + Cromatografía	1	1,3
Características morfo-culturales + PCR-RFLP	1	1,3
Características morfo-culturales + sonda	1	1,3
No informa	12	15,6
Total	77	100,0

En cuanto a las marcas comerciales empleadas, existe un claro paralelismo con las técnicas utilizadas en la identificación de modo que destaca, en primer lugar, el elevado número de centros (37,7%) que no aporta marca establecida, puesto que emplearon técnicas manuales. En segundo lugar, el elevado número de participantes que no aportan información sobre el equipo comercial usado (36,3%) se debe, por una parte, a los centros que recurren a un laboratorio externo y, por otra, a los que emplean métodos moleculares no comerciales. Finalmente, los centros que realizan la técnica de hibridación inversa suelen emplear el equipo comercial INNO-LiPA® (Innogenetics), y en dos casos el de Genotype *Mycobacteria*. Todos mostraron un excelente índice de acierto en la identificación, excepto dos en que la respuesta incorrecta fue debida a un error en la interpretación del resultado y no a un fallo del equipo.

Tabla 4. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Equipo comercial	Número	%
Manual	29	37,7
No informa	28	36,3
INNO-LiPA® Innogenetics	16	20,8
Genotype <i>Mycobacteria</i>	2	2,6
Gen-probe® bioMérieux + InnoLiPA® Innogenetics	1	1,3
Accu-probe/Gen-probe® bioMérieux	1	1,3
Total	77	100,0

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS

El estudio de sensibilidad a los antibióticos fue realizado por 40 (51,9%) de los 77 centros que enviaron hoja de respuesta con resultado evaluable. De ellos, cinco participantes (12,5%) no aportaron datos sobre el método empleado. Del resto cabe destacar los 20 centros (50,0%) que emplearon un método de difusión en disco-placa como técnica única o combinada con otras, según los antibióticos ensayados y, en segundo lugar, los 17 laboratorios (42,5%) que usaron las tiras de E-test® para la realización del antibiograma, como método único o combinado con otros.

Tabla 5. Métodos empleados en la sensibilidad.

Método	Número	%
Disco-placa	12	30,0
E-Test	9	22,5
Disco-placa + E-Test	6	15,0
Dilución en medio líquido	4	10,0
E-Test + CMI	1	2,5
E-Test + proporciones	1	2,5
Disco-placa + dilución en medio líquido	1	2,5
Disco-placa + proporciones	1	2,5
No informa	5	12,5
Total	40	100,0

En cuanto a los equipos comerciales empleados, un porcentaje muy elevado de centros (42,5%) no informó acerca de la marca comercial, incluyendo los que remitieron la cepa a un laboratorio externo de referencia para realizar el estudio de sensibilidad y los que emplearon, fundamentalmente, técnicas manuales. Como puede observarse en la tabla 6, destacan los equipos comerciales automatizados de Becton-Dickinson, que son utilizados por diez participantes (25,0%), y en segundo lugar los productos de Oxoid (antibiogramas en disco-placa) y E-test® (AB Biodisk).

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

Marca	Número	%
No informa	17	42,5
Becton-Dickinson	5	12,5
Bactec® 460 TB Becton-Dickinson	4	10,0
Oxoid	4	10,0
AB Biodisk	3	7,5
AB Biodisk + Becton-Dickinson	1	2,5
Bio-Rad + AB Biodisk	1	2,5
ESP® Culture System II Trek	1	2,5
MB/Bact®bioMérieux	1	2,5
Fabricación propia	1	2,5
Otros	2	5,0
Total	40	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 sobre tres de los fármacos para los que existen criterios interpretativos según las normas del NCCLS. Según este organismo, la realización del estudio de sensibilidad para cualquier micobacteria de crecimiento rápido está indicada siempre que se considere clínicamente significativa (aislamientos de sangre, piel, tejidos y lesiones de tejidos blandos). Además, el fracaso terapéutico en la erradicación de una micobacteria de crecimiento rápido de cualquier localización (excepto la respiratoria) después de seis meses de tratamiento antimicrobiano adecuado requiere necesariamente la confirmación de la identificación y la repetición del estudio de sensibilidad. Por ello, se ha decidido aportar algún dato que sirva de referencia a los laboratorios que realizaron dicho estudio de sensibilidad, pero sin extendernos a la totalidad de fármacos estudiados.

Tabla 7. Sensibilidad según el laboratorio de referencia.

Antibiótico	Interpretación	CMI (µg/mL)
Claritromicina	R	16,0
Ciprofloxacino	S	0,5
Linezolid	S	0,5

Entre los datos aportados por los participantes destaca la amplia variedad de antibióticos ensayados; pese a ello, desde el Control de Calidad SEIMC, se ha considerado oportuno mostrar sólo los resultados obtenidos por aquellos centros que estudiaron fármacos para los que existen criterios de interpretación según las normas NCCLS, aunque no existe un antibiograma estandarizado. Como se puede observar en la tabla 8, existe una amplia coincidencia en cuanto a la sensibilidad de la cepa frente a amikacina, ciprofloxacino y linezolid (refrendada en los dos últimos casos por los resultados de laboratorio de referencia); sin embargo, existe mayor discordancia de resultados para la claritromicina.

Tabla 8. Distribución de los resultados de sensibilidad.

Antibiótico	Sensible	Resistente	No interpreta	Intermedio	Total
Amikacina	28	–	1	–	29
Cefoxitina	4	9	1	–	14
Ciprofloxacino	28	–	2	1	31
Claritromicina	5	15	2	2	24
Doxiciclina	12	2	-	–	14
Imipenem	15	6	1	–	22
Linezolid	4	–	1	–	5
Sulfametoxazol	1	–	-	–	1
Tobramicina	11	–	1	2	14

USO DE LABORATORIO EXTERNO

De los 77 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 58 (75,3%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, cuatro (5,2%) no aportaron información sobre este dato y 15 centros (19,5%) indicaron que sí lo habían utilizado, seis de ellos (7,8%) 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 33 centros (42,9%) hace algún comentario sobre la cepa remitida, su tratamiento u otros aspectos clínicos. Entre los comentarios técnico-microbiológicos, destacan los cuatro centros que exponen que no existe un antibiograma estandarizado para esta micobacteria, o los tres que señalan que no está indicado realizarlo. El resto de centros hacen una miscelánea de comentarios referentes a cuestiones técnicas (tabla 9).

En cuanto a los aspectos clínico-terapéuticos, tres de los centros comentan que se trata de una especie poco frecuente como productora de peritonitis, otro afirma que se trata de una especie no patógena y un tercero que se trata de una especie patógena si se aísla de muestras estériles. Uno de los laboratorios afirma que, a pesar de ser poco frecuente, se puede dar en inmunodeprimidos. Por lo que respecta al tratamiento, tan sólo un laboratorio expone recomendaciones sobre la retirada del catéter y antibioterapia, y otro centro afirma que no son suficientes los fármacos habituales, pero ninguno de ellos aporta una recomendación clara sobre el antibiótico a elegir (tabla 10).

Tabla 9. Comentarios técnico microbiológicos realizados por los participantes.

Comentarios	Número
No existe un antibiograma estandarizado para esta micobacteria	4
No procede realización de estudio de sensibilidad	3
Estudio de sensibilidad contaminado. No se informa	1
Estudio de sensibilidad se envía a laboratorio de referencia	1
Identificación pendiente del laboratorio de referencia	1
Se descarta <i>M. mucogenicum</i> por cromatografía	1
Diferencia con <i>M. fortuitum</i> : temperatura, catalasa 68°, peróxido 15% y Tween 80	1
<i>M. smegmatis</i> por PCR-RFLP y crecimiento a 42°	1
Identificaciones:	
Micobacteria no MTBC ni <i>M. avium</i>	3
<i>M. smegmatis sensu strictu</i>	2
<i>M. fortuitum</i> biovariedad 3 / biovariedad <i>fortuitum</i>	2
Micobacteria ambiental de crecimiento rápido	2
Micobacteria atípica: probable <i>M. kansasii</i>	1
Micobacteria no MTBC, ni <i>M. avium</i> , ni <i>M. kansasii</i> ni <i>M. gordonae</i>	1
Posible <i>M. thermoresistibile</i>	1
Posible <i>M. goodii</i>	1

Tabla 10. Comentarios clínico-terapéuticos realizados por los participantes.

Comentarios	Número
Especie poco frecuente como productora de peritonitis	3
Especie poco frecuente que se da sobretodo en inmunodeprimidos	1
Especie no patógena	1
Especie patógena si se aísla de muestras estériles	1
Especie relacionada con infecciones en casos de diálisis peritoneal y catéter	1
Especie normalmente sensible a amikacina, cefoxitina, imipenem y macrólidos	1
Los fármacos habituales no son suficientes	1
El tratamiento consiste en retirada del catéter y antibioterapia adecuada	1