

CONTROL DE CALIDAD DE MICOBACTERIAS (MB-1/09)

En el presente control, se envió a los distintos laboratorios participantes una cepa de *Mycobacterium gastrii*, en medio de Löwenstein-Jensen. Había sido aislada de un varón de 79 años de edad con enfermedad pulmonar obstructiva crónica en grado moderado, hipertensión y mieloma múltiple. En los últimos 20 meses, el paciente había sido ingresado en varias ocasiones por episodios de reagudización relacionados con su insuficiencia respiratoria y su situación de inmunodepresión. En el último episodio, presentó un cuadro de insuficiencia respiratoria aguda, con aumento de su disnea habitual, tos, expectoración y fiebre de, al menos, 10 días de evolución. La radiografía de tórax mostró un infiltrado cavitado en el lóbulo inferior del pulmón derecho. Se tomaron muestras de esputo que fueron remitidas al laboratorio de Microbiología para estudio bacteriológico y micobacteriológico, obteniéndose, a los 12 días, el crecimiento en medio líquido de unas colonias de bacilos ácido-alcohol resistentes que constituyeron el motivo del presente control.

Se solicitó a los centros participantes la **identificación de la micobacteria** implicada en este caso clínico y el estudio de sensibilidad, si se creía conveniente, así como que formularan los **comentarios y sugerencias** que se considerasen oportunos. La cepa fue identificada, mediante métodos moleculares (hibridación y secuenciación), como *M. gastrii* por el laboratorio que actuó de referencia.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 105 centros participantes, de los que 80 remitieron la hoja de respuesta con resultados valorables, lo que supone un porcentaje de participación del 76,2%, algo inferior al de los dos últimos controles, que fue del 84,9% y 77,3%.

El Programa de Control de Calidad aceptó como óptima la identificación de especie *M. gastrii*, y como aceptable la de *Mycobacterium kansasii* Grupo 3 (III, IV, V), por la elevada similitud genética que presenta el subtipo IV de *M. kansasii* con *M. gastrii*. De hecho, algunos sistemas comerciales no las diferencian. Como puede observarse en la tabla 1, más de la mitad de los laboratorios (el 67,5%) identificaron correctamente la especie. Otros seis laboratorios (7,5%) informaron *M. kansasii* Grupo 3 (III, IV, V), con lo que el porcentaje de acierto total fue del 75,0%, inferior al de algunos controles anteriores, si bien hay que tener en cuenta las dificultades antes reseñadas.

Tabla 1. Resultados de la identificación de la cepa.

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium gastrii</i>	54	67,5
<i>Mycobacterium kansasii</i> Grupo 3 (III, IV, V)	6	7,5
<i>Mycobacterium kansasii</i>	6	7,5
<i>Mycobacterium</i> (no <i>M. tuberculosis</i>)	6	7,5
<i>Mycobacterium kansasii</i> tipo II	1	1,3
<i>Mycobacterium kansasii</i> tipo VI	1	1,3
<i>Mycobacterium celatum</i>	1	1,3
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1	1,3
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1	1,3
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	1	1,3
Micobacteria de crecimiento rápido	1	1,3
Micobacteria atípica	1	1,3
Total	80	100,0

Por lo que respecta a los métodos utilizados para la identificación, de los 80 centros que enviaron la hoja de respuesta, fueron nueve los participantes (11,3%) que no aportaron información al respecto, de los cuales siete de ellos recurrieron a un laboratorio externo de referencia, y otro no informó de esta premisa.

Tabla 2. Métodos utilizados para la identificación.

Método	Número	%
Hibridación inversa	43	53,8
Secuenciación	8	10,0
Pruebas bioquímicas	6	7,5
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa	4	5,0
Pruebas bioquímicas + secuenciación	3	3,8
Hibridación inversa + PCR-RFLP ^a	2	2,5
Sonda	2	2,5
Hibridación inversa + características morfo-culturales	1	1,2
Características morfo-culturales	1	1,2
Pruebas bioquímicas + métodos moleculares	1	1,2
No informa	9	11,3
Total	80	100,0

^aPCR: reacción en cadena de la polimerasa; RFLP: *restriction fragment length polymorphism*.

Las técnicas empleadas mayoritariamente por los centros participantes fueron los métodos moleculares, destacando, en primer lugar, las técnicas de hibridación inversa, que se usaron, bien en solitario o bien combinadas con otro método (pruebas bioquímicas, características morfo-culturales o PCR-RFLP), en 50 centros participantes (62,5%). En segundo lugar destacan las pruebas bioquímicas clásicas que, en esta ocasión, sólo fueron utilizadas en 14 centros (el 17,5%), solas o junto a métodos moleculares. Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 2.

Como ya sucedía en los últimos controles de micobacterias, al analizar los resultados, parece existir una correlación entre la mayor utilización de métodos moleculares y una mejor y más exacta identificación de la cepa. Así, de los 54 centros que informaron *M. gastri*, 33 realizaron hibridación inversa (sola o asociada a pruebas bioquímicas o a otro método molecular), 10 secuenciación, mientras que sólo 4 realizaron únicamente pruebas bioquímicas y 6 no informaron del método empleado.

En cuanto a las marcas comerciales empleadas, como se puede observar en la tabla 3, los centros que informaron una técnica de hibridación inversa, usaron la mayoría el sistema de hibridación Genotype® *Mycobacterium* de Hain (el 38,8%), seguido de INNO-LiPA® de Innogenetics (18,7%). De los 31 participantes que utilizaron el Genotype® *Mycobacterium*, 25 (el 80,6%) identificaron correctamente la cepa problema, informando *M. gastri*. Sin embargo, de los 15 laboratorios que usaron INNO-LiPA®, solamente 5 (33,3%) informaron *M. gastri*, mientras que otros 6 (40,0%) la identificaron como *Mycobacterium kansasii* Grupo 3 (III, IV, V), otros 3 centros informaron *M. kansasii* y el centro restante *M. kansasii* tipo II. Cabe recordar que el kit INNO-LiPA® identifica conjuntamente como *M. kansasii* grupo 3 los genotipos III, IV y V de *M. kansasii* y *M. gastri*, si bien ambas especies se diferencian mediante la prueba de fotocromogenicidad, que es negativa en *M. gastri* y positiva en *M. kansasii*.

Solamente dos centros emplearon una sonda de ácidos nucleicos en la identificación (Accu-probe/Gen-probe® de bioMérieux), aunque fue para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*, con lo que, obviamente, no fue capaz de identificar *M. gastri*.

Cabe destacar, nuevamente, el considerable número de participantes que no aportaron información sobre el equipo comercial usado (22,5%). Ello se explica, en parte por el uso de un laboratorio externo, pero también por el empleo de métodos moleculares no comerciales.

Tabla 3. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Método comercial	Número	% uso	% acierto
Genotype <i>Mycobacterium</i>	31	38,8	80,6
Manual ^a	18	22,5	77,8
Innolipa (Innogenetics)	15	18,7	73,3
No informa	14	17,5	71,4
Accu-probe / Gen-probe (bio-Mérieux) ^b	2	2,5	0,0
Total	80	100,0	75,0

^aSe incluyen tanto las pruebas bioquímicas como la secuenciación.

^bSe utilizó sonda para *Mycobacterium tuberculosis*.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS

El estudio de sensibilidad fue realizado por 24 (30,0%) de los 80 centros que enviaron la hoja de respuesta con resultado evaluable. Las tres técnicas empleadas mayoritariamente fueron la dilución en medio líquido (en el 45,8% de los participantes que hicieron el antibiograma, en los que en el 37,5% de los casos se utilizó de forma aislada), el método de las proporciones (en el 20,8% de éstos, siendo utilizadas en el 16,7% como método único), y el E-test® (también en el 20,8% de los centros que hicieron el antibiograma, el 8,3% como método único). Finalmente, 5 participantes (20,8%) no aportaron datos sobre el método empleado. Todos estos datos quedan resumidos en la tabla 4.

Tabla 4. Métodos empleados en la sensibilidad.

Método	Número	%
Dilución en medio líquido	9	37,5
No informa	5	20,8
Proporciones	4	16,7
E-test®	2	8,3
Dilución en medio líquido + E-test®	2	8,3
Microdilución	1	4,2
Proporciones + E-test®	1	4,2
Total	24	100,0

En cuanto a los equipos comerciales empleados, destacan los sistemas automatizados de Becton-Dickinson, en concreto, Bactec® MGIT 960, que fue usado por 10 centros (el 37,1% de los participantes que realizaron antibiograma). Tres centros realizaron dos métodos de sensibilidad, que fueron dilución en medio líquido o proporciones, junto con el E-test®. Hubo un considerable porcentaje de laboratorios (18,5%) que no aportó información acerca de la marca comercial, donde incluiríamos algunos de los participantes que remitieron la cepa a un laboratorio externo de referencia para realizar el estudio de sensibilidad. El resto de equipos informados quedan reflejados en la tabla 5.

Tabla 5. Marcas empleadas en el estudio de sensibilidad.

Marca	Número	%
Bactec MGIT 960 (Becton-Dickinson)	10	37,1
AB Biodisk	5	18,5
No informa	5	18,5
Manual ^a	4	14,8
Bactec 460 TB (Becton-Dickinson)	2	7,4
ESP (Soria Melguizo)	1	3,7
Total	27	100,0

^aIncluyen proporciones (3 centros) y microdilución (1 laboratorio).

UTILIZACIÓN DE LABORATORIO EXTERNO

De los 80 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 58 (72,5%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 15 centros indicaron que sí lo habían utilizado (18,7%), y 5 centros (6,3%) lo utilizaron parcialmente. Hubo 2 participantes (2,5%) que no aportaron información al respecto. Así, de manera similar a lo que ha ocurrido en los últimos controles, y a la vista de los resultados obtenidos, se puede decir que una parte considerable de los laboratorios que participan en el Programa de Control de Calidad disponen de los recursos técnicos necesarios para realizar el estudio de micobacterias no tuberculosas.

COMENTARIOS

Algunos participantes (15 centros) comentaron que *M. gastri* era una micobacteria mayoritariamente colonizante de las vías respiratorias y sólo en raras ocasiones era patógena, y que, por ello, el estudio de sensibilidad no estaba indicado y tampoco estaba estandarizado. Algunos de estos centros añadieron que se deberían pedir más muestras respiratorias para confirmar su presencia y descartar otros patógenos.

Cinco centros comentaron la similitud genética entre *M. gastri* y *M. kansasii* (especialmente del grupo IV), y que el INNO-LiPA® es incapaz de distinguir entre ambas especies. Cuatro centros especificaron que, de tratarse de una muestra clínica, enviarían la cepa a un laboratorio de referencia para el estudio de sensibilidad. Tres participantes comentaron que la cepa no era pigmentada y, por último, otros tres señalaron explícitamente que esta cepa era resistente (o con sensibilidad disminuida) a la isoniazida.