

## CONTROL DE CALIDAD DE MICOBACTERIAS (MB-1/10)

En este control, se envió a los participantes una cepa de *Mycobacterium bovis* BCG, en medio de Lowenstein-Jensen. Había sido aislada en un niño de cinco meses de edad, procedente del África subsahariana y diagnosticado de primoinfección por VIH, que fue llevado a Urgencias de Pediatría por presentar en la parte superior del brazo izquierdo una lesión nodular de 0,8 cm de diámetro, de algo más de un mes de evolución. A la exploración, el nódulo era eritematoso y había edema con escasa supuración amarillenta. En la exploración física, se palparon linfadenopatías regionales en la zona axilar ipsilateral. Los padres relataban que el niño había recibido todas las vacunas incluidas en el calendario vacunal de su país. Se extrajo líquido serosanguinolento de la lesión, que fue remitido al Servicio de Microbiología para cultivo bacteriológico y estudio de hongos y micobacterias. Los cultivos bacterianos fueron negativos, pero a los 28 días de incubación creció en medio de cultivo líquido para micobacterias, el microorganismo que es objeto de este 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. bovis* cepa BCG por el laboratorio que actuó de referencia.

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 109 participantes, de los que 96 remitieron hoja de respuesta. Un participante no informó de ninguna especie, con lo que se analizaron 95 respuestas con resultados valorables. Así, el porcentaje de participación real fue del 87,2%, superior al de los dos últimos controles (78,1% y 76,2%). El Programa de Control de Calidad aceptó como óptima la identificación de especie *M. bovis* cepa BCG, y como aceptables las de *M. bovis* y *Mycobacterium tuberculosis* complex, ya que algunos sistemas comerciales no diferencian las especies pertenecientes a este complejo. Más de la mitad de los centros (el 55,8%) informaron correctamente *M. bovis* BCG. Otros siete laboratorios (7,4%) informaron *M. bovis*, con lo que el porcentaje de acierto total en la especie fue del 63,2%.

**Tabla 1. Resultados de la identificación de la cepa.**

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium bovis</i> cepa BCG	53	55,8
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	29	30,5
<i>Mycobacterium bovis</i>	7	7,4
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6	6,3
Total	95	100,0

En cuanto a los métodos utilizados para la identificación, de los 95 laboratorios que enviaron la hoja de respuesta con resultados valorables, 6 participantes (6,3%) no aportaron información al respecto. En el resto, todos los centros excepto uno emplearon pruebas moleculares, en especial las técnicas de hibridación inversa, que fueron usadas, en solitario o combinadas con otro método (pruebas bioquímicas ó sondas), por 50 centros participantes (52,6%). Fueron 18 (19,0%) los laboratorios que utilizaron pruebas bioquímicas, siempre junto con métodos moleculares (tabla 2).

**Tabla 2. Métodos utilizados para la identificación.**

Método	Número	%
Hibridación inversa	38	40,0
Sonda	13	13,7
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa	5	5,2
Pruebas bioquímicas + métodos moleculares	5	5,2
Pruebas bioquímicas + sonda	5	5,2
Sonda + hibridación inversa	4	4,1
Métodos moleculares	3	3,1
Secuenciación	3	3,1
Sonda + PCR-RFLP <sup>a</sup>	3	3,1
Características morfo-culturales	1	1,1
Hibridación inversa + características morfo-culturales	1	1,1
PCR	1	1,1
PCR a tiempo real	1	1,1
PCR-RFLP <sup>a</sup>	1	1,1
Sonda + secuenciación	1	1,1
Pruebas bioquímicas + PCR a tiempo real	1	1,1
Pruebas bioquímicas + sonda + inmunocromatografía	1	1,1
Hibridación inversa + <i>spoligotyping</i>	1	1,1
Pruebas bioquímicas + sonda + hibridación inversa + secuenciación	1	1,1
No informa	6	6,3
Total	95	100,0

<sup>a</sup>PCR: reacción en cadena de la polimerasa; RFLP: *restriction fragment length polymorphism*.

Los 53 centros que identificaron correctamente la cepa como *M. bovis* cepa BCG, realizaron algún método molecular, solo o asociado a pruebas bioquímicas. La técnica mayoritariamente empleada por estos 53 laboratorios fue la hibridación inversa, informada por 29 participantes (54,7%); respecto a las pruebas bioquímicas, fueron usadas en combinación con métodos moleculares por 13 de los 53 participantes (24,5%).

La marca comercial más utilizada por el conjunto de los participantes (tabla 3) fue el sistema de hibridación inversa Genotype® *Mycobacterium* de Hain (el 43,2%), seguido de las sondas AccuProbe® Gen-Probe, bioMérieux (el 19,0%) y del INNO-LiPA® de Innogenetics (8,4%). De los 41 participantes que utilizaron el Genotype® *Mycobacterium*, 28 (el 68,3%) identificaron óptimamente la cepa problema (*M. bovis* BCG). Cabe destacar, nuevamente, el considerable número de participantes que no aportaron información sobre el equipo comercial usado (el 21,0%), probablemente debido a que muchos de ellos remitieron la cepa a su laboratorio de referencia.

**Tabla 3. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.**

Método comercial	Número	% uso
Genotype <i>Mycobacterium</i> (Hain)	41	43,2
AccuProbe (GenProbe) (bioMérieux)	18	19,0
Innolipa (Innogenetics)	8	8,4
Cepheid	2	2,1
Manual <sup>a</sup>	6	6,3
No informa	20	21,0
Total	95	100,0

<sup>a</sup>Se incluyen: pruebas bioquímicas, PCR-RFLP y secuenciación.

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

El estudio de sensibilidad fue realizado por 68 (71,6%) de los 95 centros que enviaron hoja de respuesta con resultado evaluable (tabla 4). La técnica mayoritaria fue la dilución en medio líquido, realizada por 53 centros (el 77,9% de las respuestas con antibiograma, 76,5% de forma aislada). Otros métodos empleados fueron el método de las proporciones (7,4% de los centros, 4,4% de forma aislada) y el E-test® (4,4% de los centros, 2,9% como método único).

Por otra parte, seis centros realizaron detección de algunos de los genes de resistencia a los antituberculosos, cinco de ellos mediante una prueba comercial de hibridación inversa (Genotype® MTBDR, de Hain) y el laboratorio restante por PCR-RFLP. De estos 6 participantes, 4 efectuaron únicamente pruebas genotípicas, y los 2 restantes conjuntamente con la dilución en medio líquido o el E-test®.

**Tabla 4. Métodos empleados en el estudio de sensibilidad.**

Método	Número	%
Dilución en medio líquido	52	76,5
Proporciones	3	4,4
E-test®	2	2,9
E-test® + proporciones	1	1,5
Dilución en medio líquido + proporciones	1	1,5
Difusión en Agar Middlebrook 7H11	1	1,5
No informa	8	11,7
Total	68	100,0

En cuanto a los equipos comerciales empleados, destaca con diferencia el sistema automatizado Bactec® MGIT 960, de Becton-Dickinson, que fue usado por 47 centros (el 69,1% de los participantes que realizaron antibiograma). Otros seis centros realizaron también dilución en caldo pero utilizando el sistema VersaTrek® (bioMérieux). Dos centros realizaron dos técnicas de sensibilidad que fueron el método de las proporciones con la dilución en medio líquido, y el método de las proporciones junto con el E-test®. Hubo un considerable porcentaje de laboratorios (11,7%) que no aportaron información acerca de la marca comercial, entre ellos 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)	47	67,1
VersaTrek® (bioMérieux)	6	8,6
AB Biodisk	3	4,3
Manual <sup>a</sup>	6	8,6
No informa	8	11,4
Total	70	100,0

<sup>a</sup>Incluye método proporciones (5 centros) y difusión agar Middlebrook (1).

<sup>b</sup> Hay dos centros que usan realizan dos métodos

En la tabla 6 se muestran los resultados de sensibilidad aportados por el laboratorio que actuó como centro de referencia sobre cinco de los fármacos para los que existen criterios interpretativos según el CLSI. *M. bovis* presenta resistencia natural a la pirazinamida, mientras que algunas cepas de BCG comercializadas presentan un bajo nivel de resistencia a la isoniazida.

**Tabla 6. Resultados de sensibilidad aportados por el laboratorio de referencia.**

Antimicrobiano	Concentración crítica (µg/ml)	Interpretación
Estreptomina	1	S
Etambutol	5	S
Isoniazida	0,1	R
Isoniazida	1	S
Pirazinamida	100	R
Rifampicina	1	S

Como se puede observar en la tabla 7, los resultados obtenidos frente a la estreptomina, pirazinamida, rifampicina y etambutol muestran unos porcentajes de concordancia con el centro de referencia muy elevados. Respecto a la isoniazida, el centro de referencia ha realizado el estudio de sensibilidad mediante una dilución en medio líquido con el sistema Bactec® MGIT 960 (Becton-Dickinson). Cuando emplea la concentración crítica de 0,1 µg/ml la cepa es informada como resistente a la isoniazida, mientras que a la concentración de 1 µg/ml es sensible. El valor de CMI que informan bastantes centros, aunque no todos, es el valor de la concentración crítica de la isoniazida que realizan en el Bactec® MGIT. Otros centros efectúan la CMI por otros métodos, por lo que los datos referentes a este fármaco se deben interpretar con precaución sobretodo en relación a la concentración "Isoniazida (0,1 µg/ml)".

**Tabla 7. Distribución de los resultados de sensibilidad.**

Antimicrobiano	Sensible	Resistente	Total	Concordancia (%)
Estreptomina	66	-	66	100,0
Etambutol	66	1	67	98,5
Isoniazida (0,1 µg/ml) <sup>a</sup>	17	9	26	34,6
Isoniazida (≥0,4 µg/ml) <sup>a</sup>	8	-	8	100,0
Isoniazida <sup>b</sup>	28	11	39	-
Pirazinamida	-	51	51	100,0
Rifampicina	68	-	68	100,0

<sup>a</sup>Valor de la concentración crítica de la dilución en caldo.

<sup>b</sup>Se incluyen tanto los centros que no informan el valor de la concentración crítica como aquellos que detectan la CMI por una técnica distinta a la dilución en caldo.

## UTILIZACIÓN DE LABORATORIO EXTERNO

De los 95 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 75 (79,0%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 9 centros indicaron que sí lo habían utilizado (9,5%), y 10 (10,5%) lo utilizaron parcialmente. Hubo un participante (1,0%) que no aportó 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, y que esta capacitación va en aumento, ligada a la progresiva implantación de los métodos moleculares comerciales, utilizados en este control por la práctica totalidad de los participantes.

## COMENTARIOS

Algunos participantes (9 centros) indicaron que el cuadro clínico estaba producido por una reactivación de la vacuna BCG. Siete centros especificaron que la cepa era resistente a la pirazinamida, lo que orienta a *M. bovis*. Tres centros indicaron que la cepa presentaba una resistencia de bajo nivel a la isoniazida que concordaba con un BCG. Dos centros realizaron una identificación presuntiva de *Mycobacterium africanum*. Y, por último, 2 centros señalaron que el INNOLiPA® no distingue bien entre especies del complejo *M. tuberculosis*.