

CONTROL DE CALIDAD DE MICOBACTERIAS (MB-1/12)

En este control, se envió a los participantes una cepa de *Mycobacterium marinum*, en medio de Löwenstein-Jensen. Había sido aislada de mujer de 39 años de edad, diagnosticada de infección por VIH en estadio C3, que consultaba por presentar, desde hacía aproximadamente un mes, una lesión nodular en el dorso del dedo índice de la mano izquierda que había aparecido sobre una herida traumática superficial mientras estaba limpiando la piscina. La lesión presentaba una evolución tórpida, con tendencia a la ulceración, y aparición posterior de nódulos satélites en el antebrazo y adenopatías regionales. En la exploración física destacaba una temperatura de 37,5 °C, y una lesión nodular violácea con una costra central y varios nódulos dolorosos en dorso de brazo y antebrazo, algunos de ellos fluctuantes. Se realizó biopsia de un nódulo, donde se apreciaba una paniculitis con granulomas necrotizantes. Se remitieron muestras de tejido al Servicio de Microbiología para tinción y cultivo de micobacterias. En la tinción de Ziehl Neelsen se observaban muy escasos bacilos ácido alcohol resistentes. A los diez días se obtuvo, a partir de los cultivos incubados a 30°C y 37°C, el crecimiento de la micobacteria que es objeto del presente control.

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

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 108 centros participantes, de los que 94 remitieron hoja de respuesta, todos ellos con resultados valorables, lo que supone un porcentaje de participación real del 87,0%. Este porcentaje es similar al del último control de Micobacteriología (88,4% para una cepa de *Mycobacterium tuberculosis*) y superior al control MB-2/08, en el que también se remitió una cepa de *M. marinum* (la participación en dicho control fue del 77,3%). Desde el Programa de Control de Calidad SEIMC, se aceptó únicamente como válida la identificación de especie *M. marinum*. Como puede observarse en la tabla 1, la inmensa mayoría de los centros (el 95,7%) identificó correctamente la especie. Este porcentaje de identificaciones correctas fue similar al del control MB-2/08 (93,9%).

Tabla 1. Resultados de la identificación de la cepa.

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium marinum</i>	90	95,7
<i>Mycobacterium</i> (no <i>M. tuberculosis</i>)	2	2,1
Género <i>Mycobacterium</i>	1	1,1
<i>Mycobacterium kansasii</i>	1	1,1
Total	94	100,0

Por lo que respecta a los métodos usados para la identificación (tabla 2), sólo 7 de los 94 participantes (7,4%) no aportaron información al respecto. La técnica mayoritaria fue la hibridación inversa, usada, en solitario o combinada con otro método, por al menos 66 centros (70,2%). En segundo lugar destacan las pruebas bioquímicas clásicas, las características morfo-culturales y la fotoinducción, que fueron utilizadas en 18 centros (el 19,2%), a veces junto con métodos moleculares.

Tabla 2. Métodos utilizados para la identificación.

Método	Número	%
Hibridación inversa	54	57,5
Secuenciación	7	7,4
Hibridación inversa + características morfo-culturales	4	4,3
Características morfológicas y culturales	3	3,2
Hibridación inversa + fotoinducción	3	3,2
Pruebas bioquímicas	3	3,2
Hibridación inversa + pruebas bioquímicas	2	2,1
Hibridación inversa + PCR-RFLP ^a	2	2,1
Pruebas bioquímicas + sonda	2	2,1
Secuenciación + características morfo-culturales	2	2,1
Sonda	2	2,1
Hibridación inversa + secuenciación	1	1,1
Oligocromatografía	1	1,1
Pruebas bioquímicas + métodos moleculares	1	1,1
No informa	7	7,4
Total	94	100,0

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

Este control demuestra, de nuevo, la mejora en la identificación de la cepa con la incorporación de los métodos moleculares. Así, la mayoría de los centros que identificaron correctamente la cepa como *M. marinum* (n=90) realizaron

algún método molecular, solo o asociado con pruebas bioquímicas, características morfo-culturales y/o fotoinducción. De los cuatro participantes que no acertaron en la identificación de la especie, tres comentaron que sólo disponían de sondas de nucleótidos para *M. tuberculosis* (los que informaron género *Mycobacterium*), mientras que, el centro restante que informó *Mycobacterium kansasii*, no especificó el método empleado.

La marca comercial más utilizada por el conjunto de los participantes (tabla 3) fue el sistema de hibridación inversa GenoType® *Mycobacterium* CM de Hain (el 46,8%), seguido del INNO-LiPA® de Innogenetics (17,9%). Ambas marcas mostraron un excelente índice de aciertos (100,0%). Algunos participantes que realizaron alguno de estos dos sistemas comerciales comentaron que ninguno de ellos era capaz de diferenciar *M. marinum* de *Mycobacterium ulcerans*. Para poder diferenciar ambas especies, algunos laboratorios utilizaron el GenoType® *Mycobacterium* AS de Hain (que identifica *M. ulcerans* entre otras especies, pero no *M. marinum*), o bien, se basaron en los aspectos epidemiológicos y clínicos del caso junto a las características de la colonia de micobacteria (velocidad de crecimiento y fotoinducción). Cuatro centros emplearon una sonda para la identificación, de los que sólo dos informaron la marca (Accuprobe®/Gen-probe®, bioMérieux), aunque fue para la detección de *M. tuberculosis*, obviamente incapaz de identificar *M. marinum*. Cabe destacar, nuevamente, el considerable número de centros que no aportó información sobre el equipo comercial usado (el 19,1%), 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	% acierto
GenoType® <i>Mycobacterium</i> (Hain)	44	46,8	100,0
Manual ^a	15	16,0	100,0
InnoLipa® (Innogenetics)	14	14,9	100,0
Accuprobe® (bioMérieux)	2	2,1	0,0
Speed-Oligo® <i>Mycobacteria</i> (Vircell)	1	1,1	100,0
No informa	18	19,1	88,9
Total	94	100,0	95,7

^aSe incluyen: pruebas bioquímicas, características morfo-culturales y secuenciación.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS

El estudio de sensibilidad fue realizado por 39 (41,5%) de los 94 centros que enviaron la hoja de respuesta con resultado evaluable (tabla 4). La técnica mayoritaria fue el E-test®, realizado por 14 centros (el 35,9% de las respuestas con antibiograma, 25,6% como método único). Nueve centros (23,1%) efectuaron dilución en medio líquido, siete (17,9%) microdilución, otros siete (17,9%) el método de las proporciones, y cuatro (10,3%) disco-placa. Finalmente, cuatro participantes (10,3%) no aportaron datos sobre el método empleado.

Tabla 4. Métodos empleados en el estudio de sensibilidad.

Método	Número	%
E-test®	10	25,6
Dilución en medio líquido	7	17,9
Microdilución	6	15,4
Proporciones	5	12,8
Disco-placa + E-test®	2	5,1
Proporciones + E-test®	2	5,1
Dilución en medio líquido + microdilución	1	2,6
Disco-placa	1	2,6
Disco-placa + dilución en medio líquido	1	2,6
No informa	4	10,3
Total	39	100,0

En cuanto a los equipos comerciales empleados, los más frecuentes fueron las tiras de E-test® de bioMérieux (14 centros, 31,8%), seguidas del sistema automatizado Bactec® MGIT 960 de Becton-Dickinson (8 participantes, 18,2%). De los siete centros que realizaron microdilución, seis emplearon el sistema comercial Sensititre® (13,6%), mientras que uno la hizo de forma manual (2,3%). Hubo un considerable porcentaje de laboratorios (11,4%) que no aportó información acerca de la marca comercial, entre ellos algunos de los participantes que remitieron la cepa a un centro externo de referencia para realizar el estudio de sensibilidad (tabla 5).

Tabla 5. Marcas empleadas en el estudio de sensibilidad.

Marca	Número	%
bioMérieux	14	31,8
Bactec® MGIT 960 (Becton-Dickinson)	8	18,2
Sensititre®	6	13,6
Manual ^a	11	25,0

No informa	5	11,4
Total	44	100,0

^aIncluye proporciones (7), disco-placa (3) y microdilución (1).

En la tabla 6 se muestran los resultados de sensibilidad aportado por el laboratorio que actuó como centro de referencia sobre ocho de los fármacos para los que existen criterios interpretativos según las normas del CLSI. Este organismo indica que no hay necesidad de realizar el estudio de sensibilidad a menos que haya un fallo terapéutico.

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

Antimicrobiano	Concentración crítica (µg/ml)	Interpretación ^a
Claritromicina	4	S
Cotrimoxazol	1	S
Amikacina	8	S
Etambutol	4	S
Doxiciclina	2	S
Ciprofloxacino	2	S
Moxifloxacino	2	S
Rifampicina	0,5	S

^aSensible

En la tabla 7 se resumen los resultados de las pruebas cualitativas de sensibilidad cuando el número de respuestas para un determinado antibiótico fue superior a 10. En total, se han recibido resultados correspondientes a 34 antibióticos diferentes. Como se observa en la tabla 7, existe una excelente concordancia entre los laboratorios participantes y el centro de referencia, en cuanto a la sensibilidad de la cepa frente a la rifampicina, etambutol, claritromicina, doxiciclina, amikacina y, en menor porcentaje, también para el ciprofloxacino. Hay también coincidencia en considerar resistencia a la isoniazida, pirazinamida y al p-aminosalicílico (PAS). Sin embargo, en el caso del cotrimoxazol, un 31,6% de los centros aportaron un resultado resistente, discrepante con el centro de referencia. De estos 6 centros que informaron el cotrimoxazol como resistente, 5 realizaron una prueba E-test® (en un caso junto con disco-placa), mientras que el centro restante no informó de este dato.

Tabla 7. Distribución de los resultados de sensibilidad.

Antimicrobiano	Sensible	Resistente	Total	Concordancia (%)
Amikacina	28	1	29	96,6
Ciprofloxacino	9	2	11	81,8
Claritromicina	29	1	30	96,7
Cotrimoxazol	13	6	19	68,4
Doxiciclina	16	1	17	94,1
Estreptomina	11	7	18	-
Etambutol	31	1	32	96,9
Etionamida	4	7	11	-
Isoniazida	1	18	19	-
Linezolid	9	2	11	-
Pirazinamida	0	12	12	-
Rifampicina	35	-	35	100,0

UTILIZACIÓN DE LABORATORIO EXTERNO

De los 94 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 71 (75,5%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 17 centros indicaron que sí lo habían utilizado (18,1%) y 6 centros (6,4%) lo utilizaron parcialmente. 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 la identificación de micobacterias no tuberculosas.

COMENTARIOS

Diecinueve participantes comentaron que el estudio de sensibilidad no estaba indicado, salvo cuando había una mala respuesta al tratamiento. Trece comentarios se refirieron a recomendaciones terapéuticas, principalmente el tratamiento con claritromicina y etambutol. Por último, cinco centros comentaron que la prueba de hibridación inversa no diferenciaba *M. marinum* de *M. ulcerans*.