

CONTROL DE CALIDAD DE MICOBACTERIAS (MB-1/14)

En este control, se envió a los distintos laboratorios participantes una cepa de *Mycobacterium gastri*, en medio de Löwenstein-Jensen. Había sido aislada de una mujer de 39 años de edad que desde hacía año y medio se encontraba en diálisis peritoneal continua ambulatoria por una insuficiencia renal crónica. Acudió a su hospital de área por presentar desde hacía aproximadamente una semana, un cuadro de dolor abdominal leve que se había agudizado en las últimas 24 horas. Aunque en el momento de la exploración se encontraba afebril, la paciente relataba un cuadro de febrícula vespertina, malestar general y astenia. En la exploración física, se palpaba un abdomen blando pero ligeramente distendido, con un orificio de salida de catéter de aspecto normal. Se obtuvieron muestras de líquido de diálisis que fueron remitidas al Servicio de Microbiología para estudio bacteriológico, micológico y de micobacterias. El estudio de bacterias y hongos fue negativo, pero a los 32 días creció, tanto en medio líquido como en Löwenstein-Jensen, la micobacteria que constituyó el motivo de este control.

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

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 111 centros participantes, de los que 101 remitieron hoja de respuesta con resultados valorables, lo que supone un porcentaje de participación del 91,0%. Este porcentaje es moderadamente superior al del último control de Micobacteriología (86,2% para una cepa de *Mycobacterium fortuitum*) y claramente superior al control MB-1/09, en el que también se remitió una cepa de *M. gastri* (la participación en dicho control fue del 76,2%).

El Programa de Control de Calidad aceptó como óptima la identificación de especie *M. gastri*, y como aceptable la de *Mycobacterium kansasii* grupo 3 (*M. kansasii* III, IV, V / *M. gastri*) y *M. kansasii* / *M. gastri* por la elevada similitud genética que presentan ambas especies. Como puede observarse en la tabla 1, más de la mitad de los laboratorios (el 65,3%) identificaron correctamente la especie como *M. gastri*, un centro informó *M. kansasii* / *M. gastri* y otro *M. kansasii* G3 (*M. kansasii* III,IV,V/*M.gastri*); fueron 17 laboratorios (16,8%) los que informaron *M. kansasii*. El resto de las identificaciones también quedan especificadas en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la identificación de la cepa.

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium gastri</i>	66	65,3
<i>Mycobacterium kansasii</i>	17	16,8
Género <i>Mycobacterium</i>	5	5,0
<i>Mycobacterium</i> (no <i>M. tuberculosis</i>)	5	5,0
Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3	2,9
<i>M. kansasii</i> G3 (<i>M. kansasii</i> III,IV,V/ <i>M.gastri</i>)	1	1,0
<i>M. kansasii</i> / <i>M. gastri</i>	1	1,0
Complejo <i>Mycobacterium fortuitum</i>	1	1,0
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1	1,0
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1	1,0
Total	101	100,0

Por lo que respecta a los métodos utilizados para la identificación, de los 101 centros que enviaron hoja de respuesta, fueron sólo cuatro los participantes (4,0%) que no aportaron información al respecto, de los que todos ellos recurrieron a un laboratorio externo de referencia.

Las técnicas empleadas mayoritariamente por los centros participantes fueron los métodos moleculares, destacando, en primer lugar, las pruebas de hibridación inversa, que se usaron, bien en solitario o bien combinadas con otro método (espectrometría de masas, pruebas bioquímicas, características morfo-culturales o PCR-RFLP), en 70 centros participantes (69,3%). En segundo lugar, están las técnicas de secuenciación (16S ARNr, *rpoB*, *hsp65*), que fueron usadas por 13 centros (12,9%), solas o junto a otros métodos moleculares o pruebas bioquímicas. Respecto a las pruebas bioquímicas clásicas, en esta ocasión sólo fueron utilizadas por 12 centros (el 11,9%), solas o junto a otros métodos. Por último, la espectrometría de masas se empleó también por otros 12 laboratorios (11,9%). Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 2.

Tabla 2. Métodos utilizados para la identificación.

Método	Número	%
Hibridación inversa	53	52,4
Secuenciación	7	6,9
Espectrometría de masas	5	4,9
Hibridación inversa + pruebas bioquímicas	5	4,9
Sonda	5	4,9
Oligocromatografía	3	3,0
Hibridación inversa + espectrometría de masas	2	2,0
Hibridación inversa + espectrometría de masas + secuenciación	2	2,0
Hibridación inversa + espectrometría masas + secuenciación + BQ ^a	2	2,0
Hibridación inversa + inmunocromatografía	2	2,0
Hibridación inversa + características morfo-culturales	1	1,0
Hibridación inversa + PCR-RFLP ^b	1	1,0
Hibridación inversa + pruebas bioquímicas + secuenciación	1	1,0
Hibridación inversa + secuenciación	1	1,0
Inmunocromatografía	1	1,0
PCR a tiempo real	1	1,0
Pruebas bioquímicas	1	1,0
Pruebas bioquímicas + características morfo-culturales	1	1,0
Pruebas bioquímicas + espectrometría de masas	1	1,0
Pruebas bioquímicas + PCR	1	1,0
Sonda + inmunocromatografía	1	1,0
No informa	4	4,0
Total	101	100,0

^aPruebas bioquímicas.

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

En cuanto a las marcas comerciales empleadas (tabla 3), los centros que informaron una técnica de hibridación inversa usaron en primer lugar el equipo comercial GenoType® *Mycobacterium* de Hain (el 49,2%), seguido del INNO-LiPA® de Innogenetics (7,4%). Siendo la proporción de aciertos con estos equipos del 76,7% y 55,6%, respectivamente. Cabe comentar, que en algunos centros sólo disponían del kit GenoType® CM, que no identifica la especie *M. gastri*, como sí lo hace el GenoType® AS. Respecto al kit INNO-LiPA®, identifica como *M. kansasii* grupo 3 tanto los genotipos III, IV y V de *M. kansasii* como *M. gastri*, aunque estas dos especies se pueden diferenciar mediante pruebas de fotocromogenicidad (negativa en *M. gastri* y positiva en *M. kansasii*), como informó algunos de los participantes.

Hubo 12 centros (9,8%) que usaron el Maldi-Tof (ya sea de las marcas Bruker o de Vitek), de los cuales todos ellos identificaron correctamente la cepa como *M. gastri*.

Respecto a la secuenciación, de los 7 centros que realizaron únicamente esta técnica, 4 informaron *M. gastri* y los 3 restantes *M. kansasii* (lo que podría explicarse debido a que la secuenciación del gen 16S ARNr no es capaz de discriminar entre estas dos especies).

Fueron 6 (4,9%) los centros que emplearon una sonda de ácidos nucleicos de la marca Accuprobe® / Gen-Probe® (bioMérieux), aunque en cuatro ocasiones la sonda únicamente era capaz de identificar *M. tuberculosis*. Tres participantes informaron *Mycobacterium* (no *M. tuberculosis*), dos *M. kansasii* y un centro complejo *M. tuberculosis*.

Tabla 3. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Método comercial	Número	% uso	% acierto
GenoType® <i>Mycobacterium</i> (Hain)	60	49,2	76,7
Manual ^a	25	20,5	80,0
Maldi-Tof (Bruker y Vitek)	12	9,8	100,0
InnoLipa® (Innogenetics)	9	7,4	55,6
Accuprobe® (Gen-probe, bioMérieux) ^b	6	4,9	0,0
Speed-Oligo® <i>Mycobacteria</i> (Vircell)	3	2,5	0,0
Becton-Dickinson ^c	1	0,8	0,0
No informa	6	4,9	83,4
Total	122	100,0	73,8

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

^bCuatro centros utilizaron únicamente sondas para *M. tuberculosis*.

^cInmunocromatografía para la detección de *M. tuberculosis*.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS

El estudio de sensibilidad fue realizado por 41 (40,6%) de los 101 centros que enviaron la hoja de respuesta con resultado evaluable (tabla 4). La técnica empleada mayoritariamente fue un método de dilución en medio líquido, utilizada por 19 participantes (el 46,4%, un 41,5% como método único), empleando en todos los casos un sistema automatizado. La microdilución fue informada por 11 laboratorios (26,8%), en un 24,4% de forma única. Respecto al E-test®, fue realizado por 6 centros (el 14,6% de las respuestas con antibiograma, un 7,4% como método único). La totalidad de métodos empleados quedan reflejados en la tabla 4.

Tabla 4. Métodos empleados en el estudio de sensibilidad.

Método	Número	%
Dilución en medio líquido	17	41,5
Microdilución	10	24,4
E-test®	3	7,4
Proporciones + E-test®	2	4,9
Dilución medio líquido + microdilución	1	2,4
Dilución medio líquido + E-test®	1	2,4
Disco-placa	1	2,4
Proporciones	1	2,4
No informa	5	12,2
Total	41	100,0

En cuanto a los equipos comerciales empleados, destacan, en primer lugar, y como cabría esperar del análisis de métodos, los sistemas automatizados de Becton-Dickinson, en concreto el Bactec® MGIT 960, que fue usado por el 42,2% de los participantes. A continuación se encuentran el panel de microdilución de Sensititre® (20,0%) y las tiras de E-test® de bioMérieux (13,3%). Como ya sucedía en otros controles, hubo un significativo porcentaje de laboratorios (13,3%) que no aportaron información acerca de la marca comercial, de los cuales todos ellos 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	%
Bactec® MGIT 960 (Becton-Dickinson)	19	42,2
Sensititre®	9	20,0
E-test® (bioMérieux)	6	13,3
Manual ^a	5	11,2
No informa	6	13,3
Total	45	100,0

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

En la tabla 6 se muestran los resultados de sensibilidad aportado por el laboratorio que actuó como centro de referencia sobre nueve de los fármacos para los que existen criterios interpretativos según las normas de CLSI para *M. kansasii*.

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

Antimicrobiano	Concentración crítica (µg/mL)	Interpretación ^a
Etambutol	4	S
Moxifloxacino	≤0,12	S
Linezolid	1	S
Amikacina	≤1	S
Rifabutina	0,5	S
Clarithromicina	1	S
Ciprofloxacino	≤0,12	S
Rifampicina	≤0,12	S
Cotrimoxazol	>8	R

^aR: resistente; S: sensible.

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 28 antibióticos diferentes. Como se observa en la tabla, existe una excelente concordancia entre los laboratorios participantes y el centro de referencia, en cuanto a la sensibilidad de la cepa frente a todos los antimicrobianos ensayados por el laboratorio que actuó como de referencia.

Tabla 7. Distribución de los resultados de sensibilidad.

Antimicrobiano	Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta	Total	Concordancia (%)
Amikacina	20	4	-	1	25	80,0
Ciprofloxacino	14	-	-	1	15	93,4
Claritromicina	19	-	-	-	19	100,0
Estreptomina	28	-	1	1	30	-
Etambutol	27	-	8	1	36	75,0
Etionamida	11	-	2	1	14	-
Isoniazida	10	-	22	3	35	-
Linezolid	12	-	-	1	13	92,3
Moxifloxacino	11	-	-	1	12	91,7
Pirazinamida	2	-	15	-	17	-
Rifabutina	9	-	-	1	10	90,0
Rifampicina	38	-	-	1	39	97,5

En este control se volvió a solicitar a los participantes que informasen que criterios de puntos de corte utilizaron para la interpretación del antibiograma de micobacterias. De los 41 laboratorios que realizaron antibiograma de micobacterias, 29 (70,8%) utilizaron los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) y 8 laboratorios (19,5%) según los publicados en la bibliografía. Por último, 4 centros (9,7%) se basaron en otros criterios: dos laboratorios recibieron el resultado antibiograma de su centro de referencia desconociendo que criterios había utilizado éste, un centro informó que había utilizado los puntos de corte recomendados por el BACTEC® MGIT® y por último, otro centro mencionó que el antibiograma de micobacterias “no estaba estandarizado”. Todos estos datos se resumen en la tabla 8.

Tabla 8. Criterios seguidos para la interpretación de los resultados.

Marca	Número	%
CLSI	29	70,8
Bibliografía	8	19,5
Antibiograma en centro de referencia	2	4,9
No estandarizado	1	2,4
Según puntos de corte del fabricante	1	2,4
Total	41	100,0

UTILIZACIÓN DE LABORATORIO EXTERNO

De los 101 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 78 (77,2%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 13 centros indicaron que sí lo habían utilizado (12,9%) y 9 centros (8,9%) lo utilizaron parcialmente. Hubo 1 participante (1,0%) que no aportó información al respecto.

COMENTARIOS

Algunos participantes (8 centros) comentaron que *M. gastri* era una micobacteria mayoritariamente colonizante y sólo en raras ocasiones era patógena, y que, por ello, el estudio de sensibilidad no estaba indicado y tampoco estaba estandarizado. Cuatro centros recomendaron tratamiento con etambutol más rifampicina, junto con retirada del catéter.

Cinco centros comentaron la similitud genética entre *M. gastri* y *M. kansasii* (especialmente del grupo IV), y que el INNO-LiPA® y la secuenciación del 16S ARNr eran incapaces de distinguir entre ambas especies. Otros cuatro centros comentaron que el sistema GenoType® CM no era capaz de identificar esta micobacteria.

Nueve centros especificaron que, de tratarse de una muestra clínica, enviarían la cepa a un laboratorio de referencia para el estudio de sensibilidad, mientras que otros tres añadieron que el antibiograma de la cepa se realizó en su centro de referencia.