

CONTROL DE CALIDAD DE MICOBACTERIAS (MB-2/05)

En el presente control, se envió a los participantes una cepa de *Mycobacterium kansasii* en medio de Löwestein-Jensen. Había sido aislada de un paciente varón de 59 años de edad, diagnosticado de enfermedad pulmonar obstructiva crónica con bronquiectasias, que acudió a urgencias médicas durante el curso de una infección respiratoria, presentando fiebre de 38 °C, tos, disnea y escasa expectoración. A la vista de los resultados de la exploración física y de la gasometría, se decidió su ingreso hospitalario y se tomaron dos muestras de esputo, que fueron remitidas al laboratorio de Microbiología para cultivo bacteriológico, siendo ambas negativas (flora mixta). El paciente fue dado de alta tras la mejoría de su situación respiratoria pero, al cabo de un mes, volvió a ingresar por un nuevo episodio de características similares. Se remitieron esta vez tres muestras de esputo para cultivo bacteriológico, fúngico e investigación demicobacterias, debido a la aparición en la radiografía de tórax de un patrón nodular. Aunque en la baciloscopia se informó de un resultado negativo para las tres muestras, al cabo de dos semanas de incubación se detectó crecimiento en los viales de un sistema fluorométrico automatizado. La micobacteria identificada posteriormente es la cepa objeto del presente control. Se solicitó a los laboratorios participantes la **identificación** de la cepa implicada en el cuadro clínico y, si procedía, la realización del estudio de sensibilidad. También se solicitó que formularan los **comentarios** que se considerasen oportunos.

La cepa fue identificada como *M. kansasii* tipo VI por el laboratorio que actuó de referencia mediante métodos moleculares (análisis del perfil de PRA y secuenciación del gen 16s rRNA).

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN

Se envió la cepa a un total de 93 participantes, de los que 60 remitieron hoja de respuesta con resultados valorables (identificación de la cepa), lo que supone un porcentaje de participación real del 64,5%, inferior a los últimos controles. Como puede observarse en la tabla 1, todos los laboratorios encuadraron correctamente la cepa dentro del grupo de las micobacterias. Dado el nivel de dificultad, se alcanzó un porcentaje de aciertos aceptable, si tenemos en cuenta que el 69,9% de los participantes realizó una correcta identificación de especie, que fue considerada suficiente por parte del Programa de Control de Calidad SEIMC, aunque la identificación óptima del genotipo, sólo fue alcanzada por el 18,3% de los centros. También cabe destacar que el 11,6% de los participantes que informaron que la cepa enviada correspondía a *M. kansasii*, indicaron a la vez que ésta pertenecía al grupo III (incluye genotipos III, IV, V/ *M. gastrii*) y en todos los casos, dicha identificación fue obtenida mediante un método comercial de hibridación inversa (INNO-LiPA® Innogenetics) que no tiene mayor poder discriminatorio entre los subtipos de dicha especie.

Un notable porcentaje de centros (8,4%) tan sólo realizó una aproximación genérica como micobacteria no tuberculosa, atípica o fotocromógena de crecimiento lento. El resto de las identificaciones quedan reflejadas en la tabla 1. Por otra parte, un número no despreciable de participantes identificó la cepa como *Mycobacterium szulgai* / *Mycobacterium gastrii* (11,6%), especies que presentan cierta similitud con *M. kansasii*, lo que podría explicarse considerando que algunos de estos centros sólo emplearon pruebas bioquímicas convencionales.

Tabla 1. Resultados de la identificación de la cepa.

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium kansasii</i>	23	38,3
<i>Mycobacterium kansasii</i> tipo VI	11	18,3
<i>Mycobacterium kansasii</i> grupo III / <i>M. gastrii</i>	7	11,6
<i>Mycobacterium kansasii</i> tipo IV	1	1,7
<i>Mycobacterium szulgai</i>	4	6,6
<i>Mycobacterium gastrii</i>	3	5,0
Micobacteria fotocromógena de crecimiento lento	3	5,0
Género <i>Mycobacterium</i> (no <i>M. tuberculosis</i>)	2	3,3
<i>Mycobacterium flavescens</i>	1	1,7
<i>Mycobacterium terrae</i> complex	1	1,7
Género <i>Mycobacterium</i>	1	1,7
Micobacteria escotocromógena de crecimiento lento	1	1,7
Micobacteria atípica	1	1,7
Micobacteria fotocromógena	1	1,7
Total	60	100,0

Por lo que respecta a los métodos utilizados para la identificación, de los 60 centros que enviaron hoja de respuesta, fueron diez los participantes (16,7%) que no aportaron información al respecto, de los cuales cuatro centros recurrieron a un laboratorio externo de referencia. El método mayoritario fue la bioquímica convencional, usada como única técnica o en combinación con las características morfo-culturales por 13 participantes (21,7%); cinco centros (8,3%) la utilizaron en combinación con métodos moleculares (PCR-RFLP, secuenciación) y nueve participantes (15,0%) junto a una técnica de hibridación inversa o de sondas de DNA. Las pruebas de hibridación inversa, fueron empleadas por 16 centros (26,7%), solas o junto a otros métodos moleculares (PCR-RFLP, secuenciación, sondas DNA) o pruebas bioquímicas. Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 2.

Si analizamos los resultados, parece existir, como en otros controles, 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 (especie, genotipo), emplean técnicas de biología molecular (PCR-RFLP, hibridación, secuenciación), muchas veces combinados con pruebas bioquímicas convencionales.

Tabla 2. Métodos utilizados para la identificación.

Método Identificación	Número	%
Hibridación inversa	9	15,0
Pruebas bioquímicas	8	13,3
Pruebas bioquímicas + sonda	7	11,6
Pruebas bioquímicas + características morfo-culturales	5	8,3
Secuenciación	3	5,0
Pruebas bioquímicas + métodos moleculares	2	3,3
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa	2	3,3
Sonda + PCR-RFLP + secuenciación	2	3,3
Sonda + secuenciación	2	3,3
Sonda + hibridación inversa	2	3,3
Bioquímica + hibridación inversa + PCR-RFLP	1	1,7
Bioquímica + hibridación inversa + secuenciación	1	1,7
Bioquímica + sonda + PCR-RFLP	1	1,7
Características morfo-culturales	1	1,7
Pruebas bioquímicas + secuenciación	1	1,7
Hibridación inversa + PCR-RFLP	1	1,7
Características morfo-culturales + sonda	1	1,7
Sonda	1	1,7
No informa	10	16,7
Total	60	100,0

En cuanto a las marcas comerciales empleadas destaca, en primer lugar, el elevado número de participantes que no aportan información sobre el equipo comercial usado (33,3%) lo que se explica si consideramos, por una parte, los centros que recurren a un laboratorio externo y, por otra, los que emplean métodos moleculares no comerciales; además, dado el paralelismo existente con el análisis de métodos, destaca el importante número de centros (23,3%) que no aportó marca establecida, puesto que emplearon técnicas manuales. Como se puede observar en la tabla 3, los 16 centros (26,6%) que realizan una técnica de hibridación inversa, emplean para ello el equipo comercial INNO-LiPA® (Innogenetics), y en otro caso el de Genotype *Mycobacterium*, mostrando en general, un excelente índice de acierto en la identificación. Finalmente, fueron nueve (15,0%) los centros que emplearon una sonda de ácidos nucleicos en la identificación e informaron la marca Accu-probe/Gen-probe® de bioMérieux.

Tabla 3. Sistemas comerciales utilizados en la identificación.

Equipo comercial	Número	%
Manual	14	23,3
No informa	20	33,3
INNO-LiPA® Innogenetics	14	23,3
Genotype <i>Mycobacterium</i>	1	1,7
Gen Probe® bioMérieux + INNO-LiPA®Innogenetics	2	3,3
Accuprobe/Gen-Probe® bioMérieux	9	15,0
Total	60	100,0

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS

El estudio de sensibilidad fue realizado por 22 (36,7%) de los 60 centros que enviaron hoja de respuesta con resultado evaluable. De ellos, tres participantes (13,6%) no aportaron datos sobre el método empleado. Del resto, cabe destacar que el 40,9% de los centros emplearon un método de dilución en medio líquido, tratándose en todos los casos de un sistema automatizado. El 31,8% de los centros empleó el método de las proporciones, uno de ellos combinándolo con el E-test®, que fue utilizado como método único en el 13,6% de los casos.

Tabla 4. Métodos empleados en la sensibilidad.

Método	Número	%
Dilución en medio líquido	9	40,9
Proporciones	6	27,3
E-Test®	3	13,6
No informa	3	13,6
E-Test® + proporciones	1	4,5
Total	22	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 36,4% de los participantes. En segundo lugar, existe un considerable porcentaje de centros que no aportaron

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 empleados quedan reflejados también en la tabla 5.

Tabla 5. Marcas comerciales empleadas en el estudio de sensibilidad.

Marca	Número	%
Bactec® MGIT 960 Becton-Dickinson	8	36,4
No informa	6	27,3
AB Biodisk	2	9,1
bioMérieux	2	9,1
Becton-Dickinson	1	4,5
Bactec® 460 TB Becton-Dickinson	1	4,5
ESP® Culture System II Trek	1	4,5
Izasa	1	4,5
Total	22	100,0

Por lo que respecta a los antibióticos estudiados, en la tabla 6 se muestran los resultados de sensibilidad aportados por el laboratorio que actuó como centro de referencia sobre seis de los fármacos para los que existen criterios interpretativos según las normas del CLSI (NCCLS). También informó los resultados obtenidos frente a otros tres antibióticos para los que no existen criterios interpretativos específicos, pero que el centro de referencia basa en los datos obtenidos en la literatura o referentes a otras micobacterias. Según este organismo, en caso de infección por *M. kansasii* está indicado inicialmente sólo el estudio de sensibilidad de la cepa frente a la rifampicina, ya que los casos de fracaso terapéutico suelen asociarse a resistencias a este fármaco. 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 6. Sensibilidad según el laboratorio de referencia.

Antibiótico	Interpretación	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Estreptomina	S	–
Isoniacida	S	–
Rifampicina	S	–
Etambutol	S	–
Claritromicina	S	0,25
Azitromicina	S	2
Ciprofloxacino	S	0,5
Linezolid	S	0,25
Moxifloxacino	S	0,125

Entre los datos aportados por los participantes destaca la amplia variedad de antibióticos ensayados; pese a ello, y dado que no existe un antibiograma estandarizado, desde el Control de Calidad SEIMC se ha considerado oportuno comentar sólo los resultados obtenidos con respecto a los antituberculosos clásicos y alguno de los fármacos que fueron informados por el laboratorio de referencia.

Como se puede observar en la tabla 7, existe una total coincidencia entre los laboratorios participantes y el centro de referencia, en cuanto a la sensibilidad de la cepa frente a rifampicina. Sin embargo, en el caso de la isoniacida, existen 11 laboratorios de los 19 que la estudian (57,9%) que aportaron un resultado cualitativo discordante con el centro de referencia. Respecto a este antibiótico y la especie estudiada, hay que recordar que el CLSI establece el punto de corte que indica resistencia en $5 \mu\text{g/mL}$; tres de los centros que informaron la cepa resistente a la isoniacida obtuvieron una CMI de $0,1 \mu\text{g/mL}$ y un centro de $0,4 \mu\text{g/mL}$ lo que nos indica que dichos laboratorios, no emplearon los criterios establecidos por ese organismo para este fármaco y microorganismo.

Tabla 7. Distribución de los resultados de sensibilidad.

Antibiótico	Sensible	Resistente	Intermedio	Total
Rifampicina	20	–	–	20
Isoniacida	8	11	–	19
Etambutol	16	2	–	18
Estreptomina	8	7	–	15
Claritromicina	3	–	–	3
Ciprofloxacino	2	–	–	2
Linezolid	2	–	–	2
Levofloxacino	2	–	–	2
Moxifloxacino	1	–	–	1
Amikacina	–	–	1	1
Azitromicina	1	–	–	1

Por lo que respecta al etambutol, tan sólo dos participantes de los 18 que realizaron su estudio, aportaron un resultado discordante y en ambos casos la CMI obtenida fue de 5 µg/mL. Finalmente, y en relación con la estreptomycinina, también se encuentran resultados discordantes en el 46,7% de los centros que la estudiaron. Tres de estos centros, obtuvieron una CMI de 1 µg/mL y otro centro una CMI de 4 µg/mL, lo que habla a favor de una inadecuada interpretación de los resultados cuantitativos, puesto que el punto de corte establecido por el CLSI para este antibiótico, en el caso de *M. kansasii*, es de 10 µg/mL.

USO DE LABORATORIO EXTERNO

De los 60 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 44 (73,3%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 15 centros (25,0%) indicaron que sí lo habían utilizado, ocho de ellos (13,3%) de forma parcial y tan sólo un participante (1,7%) no aportó información al respecto. Por lo tanto, a la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que una parte considerable de los laboratorios que participan en el Programa de Control de Calidad disponen de los recursos técnicos necesarios para realizar estudio de micobacterias no tuberculosas.

COMENTARIOS DE LOS PARTICIPANTES

Un total de 28 centros (46,7%) realizaron algún tipo de comentario/s sobre la cepa remitida, su tratamiento u otros aspectos microbiológicos o clínicos, por lo que en las tablas quedan reflejados un total de 32. Entre los comentarios técnico-microbiológicos, destacan los diez centros que exponen que, al realizar la sonda de ácidos nucleicos AccuProbe® específica para *M. kansasii*, obtuvieron un resultado negativo, de forma concordante a lo informado por el laboratorio de referencia. Dicho comentario es acertado, pues la negatividad de la sonda constituye una singularidad de este genotipo, como queda refrendado en la literatura por Richter *et al* (J Clin Microbiol 1999; 37:964-970), y debe tenerse en cuenta, ya que en el trabajo habitual de laboratorio puede dificultar la identificación de una cepa. Por otro lado, son tres los participantes que indican la necesidad de realizar tan sólo un estudio de sensibilidad frente a la rifampicina, tal y como recomienda el CLSI en su documento M24-A. El resto de los comentarios realizados en cada caso por un solo participante y referentes a cuestiones técnicas quedan reflejados en la tabla 8. El Programa de CC SEIMC toma nota de la observación realizada por un participante acerca de la inconveniencia de citar marcas comerciales en la historia clínica.

Tabla 8. Comentarios técnico microbiológicos realizados por los participantes.

Comentarios	Número
La sonda Accuprobe® específica de <i>M. kansasii</i> es negativa	10
Sólo hay que realizar estudio de sensibilidad a la rifampicina	2
Sólo se debe realizar sensibilidad a la rifampicina en caso de fallo terapéutico	1
Posible <i>M. intermedium</i>	1
Posible <i>M. kansasii</i>	1
Se plantea diagnóstico diferencial con <i>M. kansasii</i>	1
<i>M. kansasii</i> de distinto del genotipo I	1
Sonda <i>M. avium</i> y <i>M. tuberculosis</i> , negativas	1
Poco adecuado citar nombre comercial en la historia clínica	1
Se recomienda hacer genotipado	1
Mediante hibridación inversa (INNO-LiPA®): <i>M. kansasii</i> grupo 3	1
Antibiograma invalidado	1
Se envía fuera de plazo por obras en laboratorio	1

En cuanto a los aspectos clínico-terapéuticos, fueron cinco los centros que indicaron la recomendación terapéutica, basada en la triple asociación de isoniacida, rifampicina y estreptomycinina durante un año tras la negativización de los cultivos. Dos de los participantes, inciden sobre la necesidad de realizar una valoración del significado clínico de este tipo de aislamientos y otros dos centros comentan que se trata de una micobacteriosis pulmonar y que es necesario realizar un seguimiento clínico-radiológico del caso. Todos estos aspectos, quedan resumidos en la tabla 9.

Tabla 9. Comentarios clínico-terapéuticos realizados por los participantes.

Comentarios ^a	Número
Tratamiento: INH+RIF+ETB; 1 año tras negativización de los cultivos	5
Micobacteriosis pulmonar	1
Realizar seguimiento clínico y radiológico	1
Valorar significado clínico del aislamiento	1
Descartar colonización mediante aislamientos repetidos antes de tratamiento	1

^aAbreviaturas: INH: isoniacida; RIF: rifampicina; ETB:etambutol.