

CONTROL DE CALIDAD DE MICOBACTERIAS (MB-1/11)

En este control, se envió a los participantes una cepa de *Mycobacterium chelonae*, en medio de Lowenstein-Jensen. Había sido aislada en un varón de 58 años de edad, fumador de 20 cigarrillos/día, hipertenso y diagnosticado de EPOC de grado moderado. El paciente acudió a la consulta de Neumología y relató que desde hacía tres meses, presentaba un aumento de su disnea habitual con tos productiva y expectoración amarillenta. En la auscultación se apreciaron sibilancias en ambos campos pulmonares y disminución del murmullo vesicular. La radiografía de tórax reveló un infiltrado intersticial con imagen de cavitación en lóbulo superior izquierdo. Se recogieron tres muestras de esputo y se remitieron al Servicio de Microbiología para estudio bacteriológico y de micobacterias. El cultivo bacteriológico no aportó resultados significativos, pero a los cuatro días de incubación, creció en el medio de cultivo líquido para micobacterias, la micobacteria que es objeto de éste control.

Se solicitó a los centros participantes la **identificación de la micobacteria** implicada en este caso clínico y el estudio de sensibilidad, si procedía, así como que formularan los **comentarios y sugerencias** que se considerasen oportunos. La cepa fue identificada, mediante métodos moleculares (hibridación inversa y secuenciación), como *M. chelonae* tipo 1 por el laboratorio que actuó como centro de referencia.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN

La cepa problema fue enviada a los 112 participantes, de los que 95 remitieron hoja de respuesta con resultados valorables (identificación de la cepa). Así, el porcentaje de participación real fue del 84,8%, algo superior al del último control de micobacterias (79,8%). Desde el Programa de Control de Calidad SEIMC, se consideraron aceptables las siguientes identificaciones: *M. chelonae*, *M. chelonae* (complejo) y *Mycobacterium chelonae/abscessus/immunogenum*. La mayoría de los centros (76, el 80,0%) informaron correctamente la especie (de los cuales, 4 especificaron *M. chelonae* tipo 1). Otros 8 laboratorios (8,5%) informaron complejo *M. chelonae*, 4 (4,2%) *M. chelonae/immunogenum*, un participante (1,0%) informó *M. chelonae/abscessus* y otro (1,0%) *M. abscessus*; con lo que el porcentaje global de acierto fue del 94,7%. Todos los datos quedan reflejados en la tabla 1. Este porcentaje de aciertos es superior al del control MB-1/06 (que era del 77,4%), en el que también se remitió una cepa de *M. chelonae*.

Tabla 1. Resultados de la identificación de la cepa.

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium chelonae</i>	64	67,4
<i>Mycobacterium chelonae</i> complex	8	8,5
<i>Mycobacterium chelonae</i> (grupo II, IV)	7	7,4
<i>Mycobacterium chelonae</i> tipo 1	5	5,3
<i>Mycobacterium chelonae</i> / <i>immunogenum</i>	4	4,2
<i>Mycobacterium</i> (no <i>M. tuberculosis</i>)	4	4,2
Género <i>Mycobacterium</i>	1	1,0
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1	1,0
<i>Mycobacterium chelonae</i> / <i>abscessus</i>	1	1,0
Total	95	100,0

Por lo que respecta a los métodos usados para la identificación, sólo 4 de los 95 participantes (4,2%) no aportaron información al respecto. La técnica mayoritaria fue la hibridación inversa, usada, en solitario o combinada con otro método, por al menos 73 participantes (76,9%). Fueron solamente 11 (11,6%) los centros que utilizaron pruebas bioquímicas, y de ellos, seis las emplearon como técnicas complementarias a los métodos moleculares (tabla 2).

Tabla 2. Métodos utilizados para la identificación.

Método	Número	%
Hibridación inversa	64	67,3
Pruebas bioquímicas	5	5,1
Secuenciación	4	4,2
Sonda	4	4,2
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa	2	2,1
Pruebas bioquímicas + métodos moleculares	2	2,1
Hibridación inversa + PCR-RFLP ^a	2	2,1
Sonda + hibridación inversa + PCR-RFLP	2	2,1
Pruebas bioquímicas + secuenciación	1	1,1
Pruebas bioquímicas + hibridación inversa + PCR-RFLP	1	1,1
Espectrometría de masas	1	1,1
Hibridación inversa + características morfo-culturales	1	1,1
Hibridación inversa + secuenciación	1	1,1
Inmunocromatografía	1	1,1
No informa	4	4,2
Total	95	100,0

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

La mayoría de los centros que identificaron correctamente la cepa como *M. chelonae* (n=76) realizaron algún método molecular, solo o asociado a pruebas bioquímicas. Así, la técnica mayoritariamente empleada por estos 76 laboratorios fue la hibridación inversa, informada por 60 participantes (63,2%). Respecto a las pruebas bioquímicas, fueron usadas por 11 de los 76 participantes que informaron esta especie (14,5%), en cinco casos como método único. Otras técnicas empleadas fueron la secuenciación (en 6 centros), la PCR-RFLP (también conocida como PRA -PCR restriction analysis- en 5 centros), y la espectrometría de masas (en uno).

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 50,5%), seguido del INNO-LiPA® de Innogenetics (17,9%). Los 48 participantes que utilizaron el Genotype® *Mycobacterium*, identificaron correctamente la cepa problema (*M. chelonae*), de ellos, cuatro informaron *M. chelonae/immunogenum*. Respecto al INNO-LiPA®, los 17 participantes que realizaron esta técnica identificaron la cepa como complejo *M. chelonae*, siete de ellos informaron *M. chelonae* complex y otro *M. chelonae/abscesus*. Cabe destacar, nuevamente, el considerable número de centros que no aportó información sobre el equipo comercial usado (el 15,7%), 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)	48	50,5
INNO-LiPA (Innogenetics)	17	17,9
AccuProbe (GenProbe) (bioMérieux)	3	3,2
Becton-Dickinson	1	1,1
Maldi-Tof	1	1,1
Manual ^a	10	10,5
No informa	15	15,7
Total	95	100,0

^aSe incluyen: pruebas bioquímicas y secuenciación.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS

El estudio de sensibilidad fue realizado por 41 (43,2%) de los 95 centros que enviaron hoja de respuesta con resultado evaluable (tabla 4). De ellos, siete participantes (17,1%) no aportaron datos sobre el método empleado. La técnica mayoritaria fue el E-test®, realizado por 22 centros (el 53,7% de las respuestas con antibiograma, 46,4% como método único). Nueve centros (22,0%) efectuaron microdilución, seis (14,7%) disco-placa y dos (4,9%) dilución en medio líquido.

Tabla 4. Métodos empleados en el estudio de sensibilidad.

Método	Número	%
E-test®	19	46,4
Microdilución	6	14,7
Disco-placa	3	7,3
Disco-placa + E-test®	2	4,9
Dilución en medio líquido	1	2,4
Dilución en medio líquido + microdilución	1	2,4
Disco-placa + microdilución	1	2,4
E-test® + microdilución	1	2,4
No informa	7	17,1
Total	41	100,0

En cuanto a los equipos comerciales empleados, destaca el AB Biodisk® (actualmente bioMérieux) para las tiras de E-test®, usadas por 22 centros (47,8%). De los nueve centros que realizaron microdilución, siete emplearon el sistema comercial Sensititre® (15,2%), mientras que uno la hizo de forma manual (2,2%) y otro no aportó información al respecto. Dos centros utilizaron el sistema automatizado Bactec® MGIT 960, de Becton-Dickinson (el 4,4% de los participantes que realizaron antibiograma). Hubo un considerable porcentaje de laboratorios (17,4%) 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	%
AB Biodisk® (bioMérieux)	22	47,8
Sensititre®	7	15,2
Bactec® MGIT 960 (Becton-Dickinson)	2	4,4
Manual ^a	7	15,2
No informa	8	17,4
Total	46	100,0

^aIncluye disco-placa (6) y microdilución (1).

En la tabla 6 se muestran los resultados de sensibilidad aportado por el laboratorio que actuó como centro de referencia sobre siete de los fármacos para los que existen criterios interpretativos según las normas del CLSI. Este organismo indica que se debería realizar estudio de sensibilidad para cualquier micobacteria de crecimiento rápido que sea considerada clínicamente significativa.

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

Antimicrobiano	Concentración crítica (µg/ml)	Interpretación
Claritromicina	0,12	S
Linezolid	4	S
Tobramicina	2	S
Amikacina	2	S
Ciprofloxacino	4	R
Doxiciclina	16	R
Cefoxitina	64	R

En la tabla 7 se resumen los resultados de las pruebas cualitativas de sensibilidad cuando el número de respuestas para un determinado antibiótico fue igual o superior a 10. En total, se han recibido resultados correspondientes a 35 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 claritromicina, linezolid y tobramicina. En el caso de la cefoxitina, doxiciclina y amikacina, aunque en menor porcentaje, también la mayoría de los laboratorios coinciden con la información aportada por el centro de referencia. En el caso del ciprofloxacino, existe una mayor diversidad de resultados, aunque la mayoría de los centros informan la cepa como resistente con CMI ≥ 4 µg/mL.

Tabla 7. Distribución de los resultados de sensibilidad.

Antimicrobiano	Sensible	Intermedio	Resistente	No interpreta	Total	Concordancia (%)
Amikacina	24	1	5	-	30	80,0
Cefoxitina	2	1	22	-	25	88,0
Ciprofloxacino	6	5	19	-	30	63,3
Claritromicina	29	-	-	-	29	100,0
Cotrimoxazol	7	-	21	-	28	25,0
Doxiciclina	2	2	20	-	24	83,3
Imipenem	4	-	15	1	20	-
Linezolid	21	-	-	-	21	100,0
Tigeciclina	10	-	-	2	12	-
Tobramicina	24	-	-	-	24	100,0

UTILIZACIÓN DE LABORATORIO EXTERNO

De los 95 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 74 (77,9%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 12 centros indicaron que sí lo habían usado (12,6%), y 6 (6,3%) lo emplearon parcialmente. Tres participantes (3,2%) 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, 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

El comentario mayoritario (13 centros) fue que se deben solicitar más muestras de esputo para confirmar el aislamiento de este patógeno y descartar la colonización. Algunos de los mismos señalaron que no se recomienda antibiograma en pacientes con un solo aislamiento, ya que no se considera significativo.

Cuatro centros señalaron que la cepa era resistente a los antituberculostáticos de 1ª línea. Tres centros recomendaron el tratamiento con claritromicina + tobramicina. Otros dos centros indicaron que la técnica de referencia para el estudio de sensibilidad del CLSI era la microdilución en caldo y que existía poca correlación para algunos antibióticos entre este método y el E-test®.

Por último, cuatro centros comentaron que únicamente realizan antibiograma para *Mycobacterium tuberculosis* y ocho que el estudio de sensibilidad para micobacterias se realiza en su centro de referencia.