

## CONTROL DE CALIDAD DE MICOBACTERIAS (MB-1/13)

En este control, se envió a los participantes una cepa de *Mycobacterium kansasii*, en medio de Löwenstein-Jensen. Había sido aislada de una mujer de 52 años de edad, que acudía a puertas de Urgencias de su hospital de área por presentar un cuadro de casi tres meses de evolución de astenia, febrícula de predominio vespertino, tos escasamente productiva y ligero incremento de su disnea habitual. Como antecedentes patológicos de interés, la paciente era fumadora de 25 cigarrillos/día, y había sido diagnosticada de enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En el momento de la exploración, presentaba febrícula de 37,5°C, ligera taquipnea, y sibilancias en ambos campos pulmonares a la auscultación. La radiografía de tórax mostraba una cavitación con infiltrado pericavitario en ápex derecho. Se obtuvieron muestras de esputo que fueron remitidas al Servicio de Microbiología para cultivo bacteriológico y de micobacterias. En la tinción de gram se observó flora microbiana mixta y la baciloscopia fue negativa, pero a los ocho días se aisló en medio de cultivo líquido, la micobacteria que es objeto 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. kansasii* tipo I por el laboratorio que actuó de referencia.

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN

Se envió la cepa a un total de 108 centros participantes, de los que 95 remitieron hoja de respuesta, todos ellos con resultados valorables, lo que supone un porcentaje de participación real del 88,0%. Este porcentaje es muy similar al del último control de Micobacteriología (87,0% para una cepa de *Mycobacterium abscessus*) y también similar al control MB-1/08, en el que también se remitió una cepa de *M. kansasii* (la participación en dicho control fue del 84,9%). Desde el Programa de Control de Calidad SEIMC, se aceptó únicamente como válida la identificación de especie *M. kansasii* / *M. kansasii* grupo 1/ *M. kansasii* genotipo I.

Como puede observarse en la tabla 1, la inmensa mayoría de los centros (el 96,8%) identificó correctamente la especie, de los cuales un 10,5% informó el genotipo. El resto de los centros (3,2%) tan sólo realizaron una aproximación genérica como micobacteria no tuberculosa.

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

Identificación	Número	%
<i>Mycobacterium kansasii</i>	82	86,3
<i>Mycobacterium kansasii</i> genotipo I	10	10,5
<i>Mycobacterium</i> (no <i>M. tuberculosis</i> )	2	2,1
<i>M.</i> (no <i>M. tuberculosis</i> ) de crecimiento rápido	1	1,1
Total	95	100,0

Por lo que respecta a los métodos utilizados para la identificación, de los 95 centros que enviaron hoja de respuesta, fueron sólo tres (3,3%) los que no aportaron información al respecto; en los tres casos habían empleado un laboratorio externo de referencia.

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

Método	Número	%
Hibridación inversa	58	61,1
Sonda	11	11,7
Secuenciación	5	5,4
Oligocromatografía	3	3,3
Hibridación inversa + pruebas bioquímicas	2	2,2
Espectrometría de masas	1	1,0
Espectrometría de masas + oligocromatografía	1	1,0
Espectrometría de masas + pruebas bioquímicas	1	1,0
Espectrometría de masas + sonda	1	1,0
Espectrometría de masas + hibridación inversa + secuenciación + sonda	1	1,0
Hibridación inversa + características morfo-culturales	1	1,0
Hibridación inversa + PCR-RFLP <sup>a</sup>	1	1,0
Hibridación inversa + sonda	1	1,0
Inmunocromatografía	1	1,0
Pruebas bioquímicas	1	1,0
Pruebas bioquímicas + características morfo-culturales	1	1,0
Pruebas bioquímicas + secuenciación	1	1,0
Pruebas bioquímicas + sonda	1	1,0
No informa	3	3,3
Total	95	100,0

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

Las técnicas empleadas mayoritariamente por los participantes fueron los métodos moleculares, destacando en primer lugar las técnicas de hibridación inversa, usadas en solitario o en combinación con pruebas bioquímicas clásicas u otros métodos moleculares por 64 centros (67,4%). En segundo lugar, las sondas comerciales, que fueron usadas por 15 centros (15,8%), solas o junto a otros métodos moleculares o pruebas bioquímicas. Todos estos datos quedan reflejados en la tabla 2.

Respecto a los tres participantes que identificaron la cepa como *Mycobacterium no tuberculosis*, dos comentaron que sólo disponían de sondas de nucleótidos para *M. tuberculosis* mientras que el centro restante utilizó una inmunocromatografía para la detección de *M. tuberculosis*.

En cuanto a las marcas comerciales empleadas, como se puede observar en la tabla 3, los centros que informaron una técnica de hibridación inversa usaron para ello el equipo comercial GenoType® *Mycobacterium* de Hain (el 47,7%), seguido del INNO-LiPA® de Innogenetics (10,3%), mostrando ambos un excelente índice de acierto en la identificación. Fueron 15 (14,0%) los centros que emplearon el equipo Accuprobe® (Gen-Probe® de bioMérieux), también con excelentes resultados en la identificación de especie, si bien, dos de los centros utilizaron únicamente una sonda para la detección de *M. tuberculosis*, obviamente incapaz de identificar *M. kansasii*. En conjunto, fueron también 15 centros (14,0%) los que usaron para la identificación alguna técnica manual que incluía las pruebas bioquímicas, las características morfo-culturales, la secuenciación y la PCR-RFLP. Como dato positivo, a diferencia de otros controles de micobacterias, hubo muy pocos centros (4,7%) que no informaron del método empleado, debido principalmente, a que cada vez más laboratorios emplean métodos moleculares (o de espectrometría de masas) para la identificación de micobacterias.

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

Método comercial	Número	% uso	% acierto
GenoType® <i>Mycobacterium</i> (Hain)	51	47,7	100,0
Manual <sup>a</sup>	15	14,0	100,0
Accuprobe® (bioMérieux) <sup>b</sup>	15	14,0	86,7
InnoLiPA® (Innogenetics)	11	10,3	100,0
Maldi-Tof	5	4,7	100,0
Speed-Oligo® <i>Mycobacteria</i> (Vircell)	4	3,7	100,0
Becton-Dickinson <sup>c</sup>	1	0,9	0,0
No informa	5	4,7	100,0
Total	107	100,0	97,2

<sup>a</sup>Se incluyen: pruebas bioquímicas, características morfo-culturales y secuenciación. <sup>b</sup>Dos centros utilizaron únicamente sondas para *M. tuberculosis*. <sup>c</sup>Inmunocromatografía para la detección de *M. tuberculosis*.

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

El estudio de sensibilidad fue realizado por 51 (53,7%) de los 95 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 25 participantes (el 49,0%, un 41,2% como método único), empleando en todos los casos un sistema automatizado. El E-test® fue realizado por 13 centros (el 25,5% de las respuestas con antibiograma, un 13,7% como método único). Respecto a la microdilución, fue informada por 11 laboratorios (21,6%), un 17,6% de forma única. 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	21	41,2
Microdilución	9	17,6
E-test®	7	13,7
Dilución en medio líquido + E-test®	3	5,9
E-test® + Proporciones + Microdilución	2	3,9
Dilución medio líquido + Disco-difusión + E-test®	1	2,0
Disco-placa	1	2,0
No informa	7	13,7
Total	51	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 (Bactec® MGIT 960), que fue usado por el 37,9% de los participantes. En segundo lugar se encuentran las tiras de E-test® de bioMérieux (22,4%), seguidas del sistema Sensititre® (12,1%). Como ya sucedía en otros controles, hubo un considerable porcentaje de laboratorios (13,8%) 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)	22	37,9
E-test® (bioMérieux)	13	22,4
Sensititre®	7	12,1
Versatrek®	3	5,2
Manual <sup>a</sup>	5	8,6
No informa	8	13,8
Total	58	100,0

<sup>a</sup>Incluye disco-placa (2), proporciones (2) 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 para *M. kansasii*.

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

Antimicrobiano	Concentración crítica (µg/ml)	Interpretación <sup>a</sup>
Amikacina	2	S
Ciprofloxacino	0,5	S
Claritromicina	0,12	S
Cotrimoxazol	≤0,12	S
Etambutol	2	S
Linezolid	≤1	S
Moxifloxacino	≤0,12	S
Rifabutina	≤0,25	S
Rifampicina	0,25	S

<sup>a</sup>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 23 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, claritromicina, ciprofloxacino, y moxifloxacino, y algo menos, también al etambutol y a la amikacina. Sin embargo, en el caso de la isoniazida, se han producido un 47% de respuestas discordantes. Esto puede explicarse si consideramos que estos centros han utilizado concentraciones entre 0,1 y 0,4 µg/ml de dicho fármaco, ya que *M. kansasii* podría ser resistente a dichas concentraciones aunque sensible a una concentración de 1 µg/ml. El laboratorio de referencia no aportó interpretación para isoniazida ni para estreptomina, puesto que CLSI indica que no hay un punto de corte establecido.

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

Antimicrobiano	Sensible	Resistente	No interpreta	Total	Concordancia (%)
Amikacina	9	3	-	12	75,0
Ciprofloxacino	12	1	-	13	92,3
Claritromicina	20	1	-	21	95,2
Estreptomina	16	9	5	30	-
Etambutol	30	5	-	35	85,7
Isoniazida	18	11	5	34	53,0
Moxifloxacino	10	-	1	11	90,9
Pirazinamida	-	13	-	13	-
Rifampicina	49	-	1	50	98,0

En este control se solicitó por primera vez a los participantes que informasen que criterios de puntos de corte utilizaron para la interpretación del antibiograma de micobacterias. De los 51 laboratorios que realizaron antibiograma de micobacterias, 39 (76,4%) utilizaron los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), 1 centro (2,0%) los del EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), y 7 laboratorios (13,7%) según los publicados en la bibliografía. Por último, 4 centros (7,9%) se basaron en otros criterios: dos laboratorios recibieron el resultado antibiograma de su centro de referencia desconociendo que criterios había utilizado éste, un centro utilizó los criterios del CLSI y de la bibliografía, y por último, un 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	39	76,4
Bibliografía	7	13,7
Antibiograma en centro de referencia	2	3,9
CLSI + bibliografía	1	2,0
EUCAST	1	2,0
No estandarizado	1	2,0
Total	51	100,0

#### UTILIZACIÓN DE LABORATORIO EXTERNO

De los 95 centros que llevaron a cabo la identificación de la cepa, 77 (81,1%) afirmaron no haber utilizado un laboratorio externo de referencia, 6 centros indicaron que sí lo habían utilizado (6,3%) y 12 centros (12,6%) lo utilizaron parcialmente. Así, de manera similar a lo que ha ocurrido en los últimos controles, y a la vista de los resultados obtenidos, son cada vez más los laboratorios participantes en el Programa de Control de Calidad que ya disponen de los recursos técnicos necesarios para realizar la identificación de micobacterias no tuberculosas.

#### COMENTARIOS

El principal comentario (7 centros) se refería a recomendaciones terapéuticas, principalmente el tratamiento combinado con rifampicina más isoniazida y más etambutol, hasta 12 meses después del último cultivo negativo. Seis centros añadieron que *M. kansasii* presenta resistencia natural a la pirazinamida. Asimismo, cinco participantes añadieron que esta especie presenta resistencia de bajo nivel a la isoniazida, con lo que a concentraciones de 0,1-0,4 µg/ml era resistente a la isoniazida y a concentraciones de 1 µg/ml ya era sensible. Otros cuatro laboratorios indicaron que “de entrada” solo realizarían un estudio inicial de sensibilidad únicamente con rifampicina.

Por último, cinco laboratorios que no informaron estudio de sensibilidad comentaron que en caso de una muestra clínica, enviarían la cepa a su centro de referencia para antibiograma y otros dos centros que aún no habían recibido los resultados de sensibilidad de su centro de referencia.