

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editor: **Juan J. Picazo**

9.

Diagnóstico microbiológico
de las infecciones por
micobacterias

1

9

9

9

Coordinador: **Manuel Casal**

Antonio Guerrero
Nuria Martín
Santiago Moreno
M^a Carmen Nogales

INDICE

Introducción.

Micobacterias de interés clínico

Características del género Mycobacterium

Cuadros clínicos.

Obtención de muestras clínicas.

Diagnóstico de muestras clínicas.

Visualización.

Descontaminación.

Cultivo.

Técnicas genéticas

Proceso de identificación.

Métodos bacteriológicos.

Métodos bioquímicos.

Métodos genéticos.

Otros métodos.

Estudios de sensibilidad a antimicrobianos.

Detección de resistencias de M. Tuberculosis.

Detección de resistencias de otras micobacterias.

Marcadores Epidemiológicos.

Técnicas genéticas.

Otros marcadores.

Controles microbiológicos del tratamiento antimicrobiano.

Niveles de laboratorios de micobacteriología.

Medidas de seguridad de los laboratorios de micobacteriología.

Controles de calidad.

Bibliografía.

9. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES POR MICOBACTERIAS 1999

1.- INTRODUCCIÓN

Las enfermedades ocasionadas por micobacterias constituyen sin duda un capítulo importante de la patología infecciosa humana encuadrando enfermedades tan antiguas como la tuberculosis y la lepra y otras como las micobacteriosis.

La lepra, con un millón de casos estimados en el mundo, para la que no existen ni métodos de cultivo ni vacunas adecuadas.

La tuberculosis con 8 millones de casos en el mundo, largos períodos de tratamiento que ocasionan abandonos y resistencia a las drogas. La coinfección tuberculosis y SIDA puede aparecer en el 30-50% de casos de SIDA.

Igualmente, las micobacteriosis ocasionadas por micobacterias diferentes al *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* aumentan su incidencia debido a la inmunodepresión y de manera especial con el SIDA en cuyos enfermos *Mycobacterium avium intracellulare* se ha convertido en países como USA en un patógeno oportunista frecuente y de difícil tratamiento.

En la actualidad, el retraso diagnóstico y terapéutico y el no cumplimiento correcto de los tratamientos ha complicado el panorama de estas enfermedades, con la aparición de cepas con resistencia múltiple a fármacos.

Por todo ello pensamos que hoy la Microbiología Clínica de las micobacterias es fundamental para el diagnóstico precoz y para el control de la curación de estas enfermedades.

El objetivo de estas recomendaciones no es hacer un exhaustiva exposición o revisión de técnicas diagnósticas, que puedan encontrarse en manuales o artículos de la bibliografía existente, sino que ha sido el poner de manifiesto, a la luz de los conocimientos actuales y de la experiencia propia de los autores, los aspectos más importantes a tener en cuenta por clínicos y microbiólogos para poder realizar un diagnóstico de las enfermedades por micobacterias, lo más rápida y eficazmente posible.

2.- MICOBACTERIAS DE INTERÉS CLÍNICO

El género *Mycobacterium* incluye más de 100 especies que pueden clasificarse en seis grupos desde el punto de vista bacteriológico, pero con fines didácticos se dividen en tres apartados:

Complejo tuberculosis. Incluye las especies *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* (incluida la cepa BCG) y *Mycobacterium africanum*, productoras todas ellas de tuberculosis. Se incluye también *Mycobacterium microti*, productor de tuberculosis en rata.

Complejo lepra. En el que se incluyen las especies *M. leprae*, productor de la lepra humana, y *Mycobacterium lepraemurium*, que produce lepra en roedores.

Otras Micobacterias. Micobacterias no comprendidas en los dos grupos anteriores. Sólo algunas de ellas suelen ser patógenas, otras pueden ser patógenas oportunistas y finalmente otras suelen ser saprofitas. Producen las denominadas micobacteriosis.

3.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO MYCOBACTERIUM. M. TUBERCULOSIS

Si bien las micobacterias en general pueden variar mucho en su morfología, desde formas cocoides pequeñas a largos filamentos, *M. tuberculosis* suele tener una morfología característica, bacilo delgado de forma recta o ligeramente curvada en frotis teñidos, y su tamaño suele ser de 1-4 micras de largo por 0,3-0,5 micras de ancho. Ocasionalmente, forma ramificaciones verdaderas que se observan en cultivos enriquecidos y en frotis de ganglios linfáticos caseosos.

Son bacilos ácido-alcohol resistentes por lo que la tinción de Ziehl-Neelsen es útil para la coloración de estos microorganismos obtenidos de muestras clínicas o de cultivo. Con esta tinción, los bacilos aparecen de color rojo brillante sobre un fondo azul. Los bacilos tuberculosos son difíciles de teñir con la tinción de Gram, y se observan como bacilos gram positivos con tinción irregular.

Son bacilos no formadores de esporas, sin flagelos ni cápsula. La estructura celular de *M. tuberculosis* consta de una gruesa pared, separada de la membrana celular por el espacio periplásmico, con cuatro capas. La más interna es el glicopéptido o peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido-N-glucolilmurámico (en lugar del habitual N-acetilmurámico) con cortas cadenas de alanina, a diferencia de *M. leprae* que posee glicina. Esta capa es el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez. Externamente, hay otras 3 capas compuestas una por polímeros de arabinosa y galactosa, otra formada por ácidos micólicos (que son ácidos grasos derivados, de gran importancia taxonómica en micobacterias y otros géneros relacionados como *Nocardia*) y otra superficial formada por lípidos como los sulfolípidos, el *cord factor*, llamado así por su aparente asociación con la forma acordonada con que se agrupan las micobacterias virulentas, y los micósidos que son al igual que el anterior glicolípidos. No difiere del resto de las bacterias en cuanto al citoplasma y el ADN nuclear. Las

micobacterias son aerobios estrictos y no crecen en ausencia de oxígeno.

La mayoría de las micobacterias, y entre ellas *M. tuberculosis*, se desarrollan de forma adecuada en medios simples que contienen una fuente de carbono, una de nitrógeno e iones de metales esenciales entre ellos hierro y magnesio. Para el aislamiento primario de muestras clínicas, se requiere un medio más complejo que contenga una base de patata-huevo o una base de agar-suero. Los bacilos tuberculosos tienen un crecimiento muy lento incluso en condiciones óptimas y requiere de 10 a 20 días de incubación a 37°C. Aunque la proliferación puede tener lugar a un pH que oscila entre 6 a 7.6, el pH óptimo de crecimiento es de 7.

El tiempo de duplicación de *M. tuberculosis* en condiciones óptimas de cultivo es de 15 a 18 horas, tardando varias semanas (1 a 3) en aparecer colonias visibles en medios de cultivo.

Las micobacterias son muy resistentes a la desecación. El medio ambiente en el que se encuentran constituye un factor muy importante para su viabilidad. Por ejemplo, cuando se exponen a la luz solar directa, los bacilos tuberculosos de los cultivos son destruidos en 2 horas, pero si estos están presentes en el esputo, pueden permanecer viables durante periodos más largos.

Las micobacterias son más resistentes a la desinfección con productos químicos que otros microorganismos no formadores de esporas, probablemente como consecuencia de su contenido en lípidos. Son sensibles al calor húmedo y destruidas por las temperaturas de pasteurización.

Las mutaciones de *M. tuberculosis* se producen con muy baja frecuencia en comparación con otras bacterias, y son la base de la resistencia a los fármacos.

Se han podido aislar numerosos fagos con actividad sobre muchas especies de micobacterias incluido *M. tuberculosis*

Se están intentando purificar antígenos con el fin de obtener una prueba serológica útil para el diagnóstico clínico de la tuberculosis, lepra y las micobacteriosis humanas.

Los principales antígenos de las micobacterias pueden dividirse en dos grandes grupos:

- los solubles o citoplasmáticos.
- los insolubles ligados a la pared celular.

- a) En relación a la naturaleza de los antígenos solubles, se sabe que hay:
- b) De naturaleza polisacárida, comunes a todas las micobacterias y constituidos por arabinomananos, arabinogalactanos, glucanos.
- c) Proteínas, algunas están bastante estudiadas. Entre ellas la denominada tuberculina vieja

(OT) o el Derivado Proteico Purificado (PPD). También el antígeno 5 o el de 65 Kda.

- d) Lipídica, los monósidos de fosfatidil inositol (PIM) constituyen una familia de lípidos polares que se encuentran presentes en la membrana plasmática de las micobacterias. Entre ellos podemos citar los glicolípidos fenólicos, bastante específicos para *M. leprae* (PGL-1), para *M. kansasii* (PGL-kl) y para *M. tuberculosis* (PGL-Tbl).
- e) El denominado antígeno 60 (Ag 60) es un complejo proteico-lipopolisacárido procedente del citoplasma y de la membrana celular de *M. bovis* BCG y es común a *M. tuberculosis*, *M. bovis* y otras micobacterias.

Estudiando los antígenos en doble difusión en gel se han establecido 4 grandes grupos con mayor o menor especificidad:

- Grupo I: compuesto de antígenos comunes compartidos por todas las micobacterias e incluso algún otro género bacteriano como *Nocardia* y *Corynebacterium*.
- Grupo II: serían antígenos propios de las micobacterias de crecimiento lento.
- Grupo III: lo formarían antígenos de micobacterias de crecimiento rápido y nocardias.
- Grupo IV: constituido por antígenos propios de cada especie.

Los antígenos insolubles ligados a la pared se han usado con fines taxonómicos mediante aglutinación por especies no rugosas como *M. avium*, estableciéndose serotipos, pero no son útiles en *M. tuberculosis* por producir autoaglutinación.

M. LEPRAE

M. leprae se presenta como un bacilo habitualmente recto o ligeramente incurvado, con extremos redondeados con un tamaño de 1-8 micras de longitud por 0,3-0,5 micras de anchura. Se agrupan dentro de células, denominándose a estas formaciones "globis". Es no esporulado, inmóvil y no capsulado.

Aunque es grampositivo es difícil, al igual que *M. tuberculosis*, ponerlo de manifiesto por este método. Cuando se tiñe con método de Ziehl-Neelsen, se visualiza como un bacilo rojo sobre fondo azul, ácido-alcohol-resistente, pudiéndolo hacer de forma uniforme o presentar gránulos con mayor tamaño que el diámetro promedio de la célula. Los bacilos que toman la coloración ácido-alcohol-resistente de manera uniforme son células viables y sanas mientras que es probable que los que presentan granulaciones en rosario no sean viables. La ácido-alcohol-resistencia de *M. leprae* puede ser eliminada por medio de la extracción preliminar con piridina, una propiedad útil para

diferenciar a este microorganismo de la mayor parte de las otras micobacterias.

Puede emplearse también para visualizarlo la fluorescencia con auramina o naranja de acridina. Sin embargo a diferencia de otras micobacterias no se colorea en negro Sudán III y posee actividad fenolásica. *M. leprae* presenta una triple cubierta rica en polisacáridos externos y en peptidoglicano basal que forma la pared que rodea al citoplasma. Peptidoglicano arabinogalactanos y micolatos contribuyen significativamente a la integridad estructural de la pared. En cambio otros, glicolípidos, glicopeptidolípidos y trehalosa que contienen lipooligosacáridos se han encontrado que son componentes activos de las micobacterias.

La más notable de las moléculas de glicolípidos asociados a la pared celular de *M. leprae* es el glicolípido fenólico I (PGL-I), con un trisacárido especial que ha demostrado ser especie específico e inmunogénico durante la infección de *M. leprae*. La presencia de glicina en vez de alanina en la pared le dota de fragilidad y crecimiento aberrante. El citoplasma posee una estructura central con ácidos nucleicos y ribosomas.

M. leprae se desarrolla lentamente y tiene un tiempo de generación de 1 día. Se comporta como un parásito intracelular obligado. Hasta el presente no se ha conseguido su cultivo en medios de laboratorios.

M. leprae posee varios antígenos de superficie y citoplasmáticos, algunos de los cuales son comunes a otras micobacterias y nocardias.

Ciertos polisacáridos estimulan títulos elevados de anticuerpos que presentan reacciones cruzadas

con antígenos de otras micobacterias. Las proteínas desencadenan una reacción de sensibilidad tardía que se manifiesta por la cutireacción de Fernández a las 48 horas similar a la reacción de la tuberculina.

OTRAS MICOBACTERIAS

Todas las micobacterias no comprendidas dentro del "complejo tuberculosis" (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*) ni del complejo *M. leprae* han recibido a través de los tiempos muy diferentes nombres en un intento de agruparlas a todas. Hoy deben de individualizarse y denominarse cada una según su nombre binomial aceptado científicamente. A la visión microscópica en una baciloscopia pueden parecer idénticas al ya citado *Mycobacterium tuberculosis* y confundirse con él, pero si se estudian desde el punto de vista bacteriológico de manera más detallada, muestran una serie de diferencias que hacen que actualmente se hayan descrito unas cien especies diferentes a *M. tuberculosis*, de las que se aceptan internacionalmente más de 50. Éstas se clasifican en seis grupos desde el punto de vista bacteriológico, basados en su velocidad de crecimiento (rápido o lento, según sea inferior o superior a una semana en medio sólido) y producción de pigmento en presencia o ausencia de luz (fotocromógeno o escotocromógeno) (Tabla1). Algunas de estas micobacterias se han descrito como patógenas, otras pueden ser patógenas oportunistas y finalmente otras que, aunque pueden encontrarse en productos patológicos humanos, hasta el momento presente suelen ser saprofitas.

TABLA 1.- CLASIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS

Grupos de crecimiento lento	Grupo I Fotocromógenas	Grupo II Escotocromógenas	Grupo III No cromógenas
	<i>M. Kansaii</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. intermedium</i>	a) Pigmento rosa-rojo: <i>M. lactis</i> b) Pigmento amarillo-naranja: <i>M. gordonae</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. flavescens</i> <i>M. szulgai</i> c) Pigmento irregular <i>M. xenopi</i> <i>M. simiae</i> <i>M. ulcerans</i>	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. gastri</i> <i>M. terrae</i> <i>M. triviale</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. shimoidei</i> <i>M. celatum</i> <i>M. interjectum</i> <i>M. branderi</i> <i>M. genavense</i>
Grupos de crecimiento rápido	Grupo IV Fotocromógenas	Grupo V Escotocromógenas	Grupo VI No cromógenas
	<i>M. marinum</i>	a) Pigmento rosa-rojo: <i>M. engbaeckii</i> b) Pigmento amarillo-naranja: <i>M. acapulcense</i> <i>M. aurum</i> <i>M. duvalii</i> <i>M. gadium</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. gilvum</i> <i>M. obuense</i> <i>M. rhodesiae</i> <i>M. aichiense</i> <i>M. chubuense</i> <i>M. tokaiense</i> c) Pigmento irregular <i>M. phlei</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. parafortuitum</i> <i>M. diernhoferi</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. austroafricanum</i>	<i>M. fallax</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. agri</i> <i>M. chitae</i> <i>M. moriokaiense</i> <i>M. confluentis</i> <i>M. mucogenicum</i>

No se incluyen en esta clasificación especies que no suelen aislarse de productos patológicos humanos, sino ambientales como: *M. alvei*, *M. brumae*, *M. chlorophenicum*, *M. farcinogenes*, *M. hiberniae*, *M. holderi*, *M. komosense*, *M. lepraemurium*, *M. madagascariense*, *M. mageritense*, *M. microti*, *M. porcium*, *M. poriferae*, *M. pulveris*, *M. senegalense*, *M. sphagni*.

MICOBACTERIAS DE CRECIMIENTO LENTO
Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare

Existe una considerable superposición entre las propiedades de los dos patógenos no fotocromógenos principales. *M. avium* y *M. intracellulare*, lo que dificulta mucho la

determinación de la especie de las cepas. Dado que la diferenciación entre las dos especies es difícil, se emplea el término complejo *M. avium-M. intracellulare* (MAC) para referirse a estas micobacterias, *M. avium* está constituido por tres serotipos diferentes por aglutinación, mientras *M. intracellulare* contiene unos 25 serotipos.

Actualmente, con sondas de ADN se intenta su diferenciación.

En las muestras clínicas, los microorganismos son pleomórficos, pero en los medios de cultivo habitualmente se presentan como bacilos cortos con gránulos ácido-alcohol resistentes bipolares. Casi todas las cepas de *M. avium* virulentas, crecen mejor a 44°C que a 37°C, en tanto que la mayor parte de las cepas de *M. intracellulare* prefieren la temperatura inferior. Sin embargo, por subcultivos repetidos en el laboratorio, las variantes virulentas de las cepas avirulentas se pueden adaptar a un buen desarrollo a 37°C y entonces son indistinguibles de las cepas avirulentas de *M. intracellulare* por las pruebas habituales. Las colonias de los aislamientos primarios son predominantemente delgadas, translúcidas y lisas, pero con frecuencia se producen unas pocas colonias rugosas. En los subcultivos, las colonias se vuelven más opacas y con forma de cúpula. Junto con este tipo de variaciones en las colonias se presentan cambios en la virulencia y en otras propiedades. Con anterioridad a 1982 y al comienzo de la era del SIDA el compromiso extrapulmonar era raro. En la actualidad la infección por *M. avium* *M. intracellulare* se reconoce como a una de las complicaciones del SIDA.

Mycobacterium Kansaii

Los bacilos de *M. Kansaii* habitualmente son más largos y más anchos que los de *M. tuberculosis* y con la coloración para ácido-alcohol resistencia, de manera característica se tiñen de forma desigual para dar un aspecto en bandas o en rosario. Lo habitual es que los microorganismos se dispongan en cordones curvos.

M. Kansaii es fotocromógeno. Las colonias, que son visibles después de 1 a 2 semanas de incubación en la oscuridad, en medios de glicerol-huevo, en general son lisas de y de color marfil. Si se desarrollan en la luz son de color amarillo limón.

***Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium haemophilum*.**

Son especies no fotocromógenas con propiedades bioquímicas similares a *M. avium*, *M. malmoense* parece inducir un serotipo aglutinante diferente y se asocia con enfermedad pulmonar. *M. haemophilum* es la única micobacteria de crecimiento lento, incapaz de multiplicarse en ausencia de hemina. También requiere una temperatura de 30 a 32°C y no crece a 37°C. Es probable que este microorganismo en ocasiones no sea aislado de muestras clínicas debido a que no se emplean los medios y las condiciones de cultivo adecuadas.

Mycobacterium scrofulaceum

M. scrofulaceum es un microorganismo más largo, más grueso y con una disposición en rosario más grosera que *M. tuberculosis*. En medios líquidos, los microorganismos se distribuyen al azar y no presentan evidencias de formación de cordones. *M. scrofulaceum* es escotocromógeno, y produce colonias compactas en forma de cúpula, las cuales son amarillas a anaranjadas cuando se proliferan en la oscuridad pero desarrollan una pigmentación anaranjada rojiza con una exposición continua a la luz.

Mycobacterium simiae

M. simiae se aisló por primera vez en 1965 a partir de monos enfermos. Desde entonces este microorganismo ha sido encontrado en asociación con enfermedad humana. También se lo ha aislado del medio ambiente de suministros de agua.

El microorganismo es fotocromógeno y produce colonias pequeñas disgónicas, que al comienzo presentan un color ante pero que gradualmente se vuelven amarillas por exposición a la luz. Su propiedad más característica es la producción de niacina, un rasgo que no se observa en las otras micobacterias atípicas. *M. simiae* es muy resistente a los fármacos antituberculosos.

Mycobacterium szulgai

M. szulgai se parece a *M. scrofulaceum* y al no patógeno *M. gordonae*, pero se diferencia de ellos tanto bioquímica como serológicamente.

El microorganismo debe ser diferenciado de *M. gordonae*, un escotocromógeno de crecimiento lento que se aísla con frecuencia del esputo de pacientes que no presentan infecciones micobacterianas.

Se comporta como escotocromógeno cuando se incubaba a 37°C y fotocromógeno si es incubado a 27°C.

Mycobacterium ulcerans

M. ulcerans produce una enfermedad cutánea destructiva principalmente tropical, sobre todo en ciertas áreas de África, Nueva Guinea, América del Sur y Norte de Australia, aunque también se han descrito de modo esporádico en otros lugares. Si no se trata en una etapa temprana, provoca úlceras crónicas con centros necróticos. En los cultivos, los bacilos miden 0,5 micras de ancho y 1,5 a 3µ de largo, pero en cortes histológicos habitualmente son más grandes y con aspecto en rosario. La temperatura óptima para el desarrollo es de 30 a 33°C y no proliferan a 25°C ni a 37°C. Su multiplicación es muy lenta, y se requieren de 6 a 12 semanas para el aislamiento primario. En el medio de Lowenstein-Jensen, se desarrollan colonias rugosas y cupuladas de color amarillo limón.

Mycobacterium xenopi

Aunque el primer aislamiento se realizó en un animal de sangre fría, el sapo *Xenopus laevis*, este microorganismo crece mal a 37°C, y prefiere temperaturas de 42-45°C. Para el aislamiento primario, se necesitan de 3 a 4 semanas o más. Las colonias características son muy pequeñas y granulares y cuando se las observa con el microscopio presentan una red periférica de hifas. En la incubación prolongada, se desarrolla de forma gradual una pigmentación amarilla. En las tinciones, los bacilos son más largos y delgados que lo habitual y con frecuencia se disponen formas arqueadas típicas en nidos de pájaros. *M. xenopi* ha sido aislado del agua, tanto de agua corriente fría como caliente.

MICOBACTERIAS DE CRECIMIENTO RAPIDO

Mycobacterium marinum

M. marinum es una especie fotocromógena implicada en una enfermedad cutánea granulomatosa conocida habitualmente como "granuloma de las piscinas". *M. marinum* crece con rapidez a 30-32°C en cualquiera de los medios que a menudo se emplean para micobacterias pero no lo hace si se le incuba a 37°C. En el medio de Lowenstein-Jensen las colonias son blancogrisáceas con estrías de color amarillo pálido pero expuestas a la luz temperatura ambiente, desarrolla una intensa pigmentación amarillo-anaranjada.

Las lesiones se presentan en el sitio de abrasiones menores, en especial en los codos y en las rodillas. La infección habitualmente comienza 2 a 3 semanas después de la exposición como una pequeña pápula, que poco a poco aumenta de tamaño, se ulcera y segrega pus que contiene microorganismos ácido-alcohol resistentes.

Se encuentra presente en el agua dulce y salada y en los peces de estas aguas.

Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium chelonae

En la actualidad, *M. fortuitum* y *M. chelonae* son especies bien definidas, pero debido a que comparten una serie de características similares y a que con frecuencia se las encuentra en los mismos tipos de infección, antes han recibido el nombre de complejo *M. fortuitum-M. chelonae*. Los microorganismos de este grupo son pleomórficos y presentan diferentes grados de ácido-alcohol resistencia. En pus se observan formas largas y filamentosas. Las colonias que se desarrollan después de 72 horas de incubación a 37°C en el medio 7H 10 son no pigmentadas y habitualmente grandes y rugosas, pero en algunos medios también se desarrollan colonias cerasas y lisas. Algunas cepas de *M. fortuitum* pueden tener aspecto similar y ser identificadas de forma

incorrecta como *M. tuberculosis* si los cultivos no son inspeccionados durante las 3 a 4 semanas siguientes a la incubación.

Una manifestación clínica frecuente es un absceso que se presenta en el sitio del traumatismo, en general en el sitio de la inyección de productos supuestamente estériles. Con menor frecuencia se trata de úlceras corneanas posteriores a algún tipo de lesión penetrante e infección pulmonar. La infección pulmonar por *M. fortuitum* no se puede diferenciar radiológicamente de la tuberculosis.

4.- CUADROS CLÍNICOS.

Las micobacterias incluyen microorganismos que en relación con el hombre se comportan como patógenos obligados (es el caso del complejo *M. tuberculosis* y *M. leprae*), patógenos oportunistas y saprofitos. Muchas de ellas pueden aislarse de muestras ambientales, como la tierra o el agua. Aunque los cuadros clínicos en los que pueden verse implicadas las micobacterias son muy variados, deben conocerse cuáles son aquéllos que con mayor frecuencia producen cada una de las especies.

Mycobacterium tuberculosis complex

La tuberculosis constituye una de las enfermedades infecciosas de mayor prevalencia y es la primera causa de muerte por enfermedad prevenible a nivel mundial. Así hoy, la tuberculosis supone un importante problema de salud pública con una incidencia que se ha elevado en muchos países en los últimos años. La epidemia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, el aumento de la indigencia en los grandes centros urbanos y la inmigración de habitantes de áreas geográficas con alta prevalencia de tuberculosis se han señalado como causas más importantes que han contribuido a revertir la curva decreciente de nuevos casos de tuberculosis que se venía observando en los países occidentales.

El riesgo de padecer tuberculosis es variable, dependiendo de la presencia de determinados factores de riesgo. La adquisición de la infección tiene lugar por vía aérea, con un riesgo que es similar para todos los sujetos, variando exclusivamente con la capacidad infectiva de la persona enferma y la proximidad del contacto. Tras la infección primaria, la progresión a enfermedad sí que es variable de unas personas a otras. En los niños menores de 5 años y en personas inmunodeprimidas (por efecto del VIH o por otra causa) existe un riesgo elevado de una rápida progresión (en semanas o meses) a enfermedad activa, con frecuencia diseminada. En los adultos, no inmunodeprimidos, existe mayor posibilidad de que la infección entre en un estado de latencia, con riesgo de reactivación en los años

siguientes. Globalmente, aproximadamente un 10% de las personas infectadas desarrollarán tuberculosis activa a lo largo de su vida, con el mayor riesgo en los dos años siguientes a la infección. Entre los factores que aumentan de modo significativo el riesgo de desarrollar tuberculosis a partir de una infección latente se incluyen la infección por el VIH, la inmunodepresión de cualquier origen, gastrectomía, malnutrición o la insuficiencia renal crónica. Las personas con infección latente pueden ser identificadas mediante la prueba de la tuberculina (PPD), que permite identificar a las personas infectadas que se pueden beneficiar de recibir quimioprolifaxis para evitar el desarrollo de la enfermedad.

La localización más frecuente de tuberculosis en el adulto inmunocompetente es la pulmonar. Habitualmente, se presenta como una enfermedad de curso subagudo caracterizada por fiebre de bajo grado de predominio vespertino, tos persistente, sudoración nocturna, expectoración y, más raramente, hemoptisis. Radiológicamente, suele presentarse como un infiltrado en lóbulos superiores, con frecuencia cavitado, y no siendo raro el derrame pleural como única manifestación radiológica. Ocasionalmente, en las personas inmunocompetentes, la tuberculosis puede presentarse con afectación extrapulmonar o diseminada. Estas son, sin embargo, las formas clínicas más frecuentes en las personas con SIDA o inmunocomprometidas por otras causas. Entre los órganos que con mayor frecuencia se afectan se incluyen los ganglios linfáticos, el hígado, el bazo, el riñón, el sistema nervioso central y el pericardio. No es raro el aislamiento de *M. tuberculosis* a partir de la sangre en personas inmunocomprometidas.

Las otras especies del complejo *M. tuberculosis*, que producen enfermedad humana son *M. bovis* y *M. africanum*. *M. bovis* produce fundamentalmente enfermedad en los animales, aunque puede ser adquirido por el hombre, constituyendo en la mayoría de los casos una enfermedad profesional. La enfermedad que produce en el hombre es indistinguible de la que produce *M. tuberculosis*. *M. africanum* causa tuberculosis humana en países del África tropical.

Mycobacterium avium complex.

Las especies del complejo *M. avium* (MAC) son microorganismos ubicuos, que pueden aislarse con frecuencia de múltiples fuentes ambientales. Hasta la aparición del SIDA, MAC había sido descrito como raro productor de enfermedad en el humano. Se había implicado como causa de adenitis en niños, en los que constituía la causa más frecuente en países con baja prevalencia de tuberculosis, y, sobre todo, como causa de enfermedad pulmonar en personas como

afectación crónica de las vías respiratorias o del parénquima pulmonar. MAC se ha descrito produciendo nódulos pulmonares solitarios, sobreinfección de bronquiectasias, cuadros diseminados en el pulmón, sobre todos en inmunocomprometidos. Fuera de los cuadros mencionados, MAC había sido muy raramente causante de cuadros de infección diseminada. En los pacientes con SIDA, la enfermedad diseminada por MAC constituye una de las complicaciones frecuentes en algunos países (Estados Unidos, Australia), sobre todo en pacientes con enfermedad avanzada (menos de 50 linfocitos CD4/mm³). Se han registrado, sin embargo, diferencias notables en su incidencia de unos países a otros, constituyendo una complicación relativamente rara en algunas áreas. Se ha especulado con que el padecimiento de tuberculosis previa pudiera proteger, por inmunidad cruzada, del desarrollo posterior de enfermedad por MAC. La presentación habitual es de enfermedad diseminada con afectación de múltiples órganos y aislamiento a partir de sangre, y también de médula ósea, hígado y otros órganos donde puede causar enfermedad focal.

Otras micobacterias

La mayoría de micobacterias diferentes a *M. tuberculosis* y *M. leprae* se aíslan a partir del agua y del suelo, pero pueden también aislarse de otras múltiples fuentes, como el polvo de casa o incluso instrumental o soluciones para uso médico o de laboratorio. Ello explica que las micobacterias pueden ser colonizadoras habituales de superficies mucosas corporales o ser contaminantes en el laboratorio y, por este motivo, para evitar atribuir a una micobacteria la causa de una enfermedad se han elaborado criterios estrictos que la diferencien de la colonización o contaminación. Estos criterios deben ser más estrictamente aplicados en circunstancias en las que la colonización/contaminación es más probable, como en las enfermedades pulmonares crónicas.

Estos criterios de patogenicidad que deben tenerse en cuenta para aceptar el papel patógeno de una micobacteria son los que exponemos a continuación de una manera exhaustiva. Ello no quiere decir que deban coexistir todos, sino que según se cumplan más o menos algunos de ellos tendremos menor o mayor certeza de que se trata de una micobacteriosis.

1.- Evidencia de afección clínica que pueda deberse a esa micobacteria.

2.- Ausencia de *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. bovis* en todas las muestras tomadas del paciente para comprobar la etiología del proceso.

3.- Aislamiento repetido en el paciente en varias muestras tomadas en distintos momentos de la misma especie de micobacteria.

4.- Aislamiento abundante de la micobacteria a ser posible.

5.- Aislamiento, si es posible, del mismo tipo de micobacteria hallado en la muestra (p. ej., esputo) de la zona de tejido del enfermo afectado por el proceso en estudio mediante exéresis quirúrgica, biopsia, etc. (p. ej., pulmón).

6.- Comprobación, si es posible, de las lesiones histopatológicas específicas típicas de los órganos afectados.

7.- Reacción inmunológica positiva en el paciente a la "sensitina" específica preparada con dicha micobacteria, significativamente más intensa que la ocasionada en el enfermo con la "tuberculina".

8.- Repercusión favorable en las manifestaciones por la terapéutica instaurada según el antibiograma previamente realizado a la micobacteria considerada responsable.

La tabla 2 incluye las micobacterias que con mayor frecuencia se han comportado como patógenas en el hombre y las enfermedades en las que se ha implicado. El resto de micobacterias no se han asociado con enfermedad en el hombre o se ha hecho sólo muy raramente.

Tabla 2. Especies de micobacterias que pueden producir enfermedades en el hombre.

Especie de Micobacteria	Enfermedad más frecuente
<i>M. avium-intracellulare</i>	Enfermedad pulmonar, linfadenitis cervical en niños, enfermedad diseminada (SIDA)
<i>M. celatum</i>	Enfermedad pulmonar similar a tuberculosis Enfermedad diseminada (SIDA)
<i>M. genavense</i>	Enfermedad diseminada similar a MAC (SIDA)
<i>M. haemophilum</i>	Nódulos cutáneos, inf. diseminada (SIDA)
<i>M. kansasii</i>	Enfermedad pulmonar similar a tuberculosis. Enfermedad diseminada (SIDA)
<i>M. malmoense</i>	Enfermedad pulmonar crónica
<i>M. marinum</i>	Infección cutánea
Rápidos crecedores (<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i>)	Infecciones de partes blandas, osteomielitis, enfermedad diseminada, infección de herida quirúrgica
<i>M. scrofulaceum</i>	Linfadenitis cervical en niños
<i>M. simiae</i>	Enfermedad pulmonar crónica
<i>M. szulgai</i>	Enfermedad pulmonar similar a tuberculosis
<i>M. ulcerans</i>	Úlceras cutáneas (úlceras de Buruli en África, úlceras de Baimsdale en Australia)
<i>M. xenopi</i>	Enfermedad pulmonar crónica

5.- OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS CLÍNICAS

Las normas generales de obtención de muestras para el diagnóstico microbiológico deben ser observadas igualmente para el estudio de las micobacterias. Resaltamos aquellos puntos que pueden ser más específicos:

5.1.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS CLÍNICAS

5.1.1.- ESPUTO Y OTRAS MUESTRAS RESPIRATORIAS

El enfermo ha de ser instruido sobre la forma más adecuada de recoger el esputo, informarle de la importancia que tiene la muestra y que conozca la

diferencia entre esputo, saliva y secreciones rinofaríngeas.

- El paciente debe de realizar la recogida de muestra en áreas bien ventiladas y tomar todas las precauciones posibles par proteger al personal que le rodea del contagio.
- El esputo recogido por expectoración debe realizarse a primera hora de la mañana, en cantidad entre 5 a 10 ml. Pequeños volúmenes, especialmente, menos de 2ml, puede bajar la probabilidad de detección de micobacterias.
- Los esputos obtenidos 1 ó 2 después de la broncofibroscopia son con frecuencia más productivos que los obtenidos antes de la misma.
- Los laboratorios deberían de ser informados del tipo de esputo que se envía. Asi un esputo

inducido puede ser tomado por saliva debido a su acuosidad.

- Los laboratorios deben de informar al médico clínico sobre el volumen y calidad de la muestra enviada, lo cual es sumamente importante en relación con los resultados.
- Cuando la muestra enviada no parece un verdadero esputo o el volumen es pequeño, el laboratorio debe requerir otra muestra que sea de vías bajas.
- En aconsejable un estudio seriado de tres muestras de días consecutivos para obtener mayor rentabilidad.
- Cuando el enfermo no expectora, la broncofibroscopia es la técnica de elección, ya que permite realizar broncoaspirados selectivos, lavado broncoalveolar y biopsia de las lesiones bronquiales, siendo su rentabilidad superior normalmente a la del aspirado gástrico en ayunas. Si bien en algunos casos se han comunicado resultados del aspirado gástrico con buena rentabilidad.

5.1.2.- JUGO GÁSTRICO

- Las muestras de jugo gástrico deben procesarse antes de 4 horas después de su obtención, si esto no es posible debe neutralizarse con carbonato sódico, ya que el ácido destruye a las micobacterias.

5.1.3.- ORINAS

- Es la muestra habitual para llegar al diagnóstico de tuberculosis renal. No es necesario ni recomendable el sondaje, ni la orina obtenida durante 24 horas. Para la obtención de la muestra, lo usual y más adecuado es recoger la primera orina de la mañana.

La eliminación de BAAR por la orina es en general discontinua por lo que se deben procesar tres muestras en días sucesivos.

5.1.4.- HECES

- Las muestras de heces normalmente, sólo son útiles en casos de SIDA para el diagnóstico de presencia de *M. avium*, si bien de ellas pueden aislarse otras micobacterias.

5.1.5.- LÍQUIDOS ORGÁNICOS

En los líquidos orgánicos como LCR, L. pleural, L. peritoneal o L. pericárdico, es importante la siembra de la mayor cantidad posible de muestra, ya que en la mayoría de las ocasiones el número de bacilos en las mismas es muy bajo.

5.1.6.- HEMOCULTIVOS

- El incremento de las infecciones diseminadas por *M. avium intracellulare* u otras micobacterias de reciente descripción, y *M. tuberculosis*, en pacientes con SIDA ha generado la introducción de nuevas técnicas para la detección de micobacterias en sangre.

La lisis centrifugación y el sistema radiométrico BACTEC 460 son los más usuales. También se han comunicado buenos resultados con el sistema ESP.

El envío de hemocultivo para el estudio de micobacterias debe ser utilizado normalmente para pacientes con SIDA que posean linfocitos normalmente CD4 por debajo de 50 y fiebre de origen desconocido.

5.1.7.- BIOPSIAS

- Siempre que se practique una biopsia de cualquier órgano por sospecha de tuberculosis, deberá remitirse un fragmento al laboratorio de Microbiología y otro al de Anatomía Patológica. La muestra destinada a estudios microbiológicos debe enviarse sin fijar, con unas gotas de agua destilada para evitar la desecación.

5.1.8.- MUESTRAS DE TEJIDO Y OTRAS VARIAS

Las muestras de tejido, que reciben un procesamiento similar a los líquidos orgánicos, no siempre son rentables en el aislamiento de micobacterias. Si bien a veces son la única muestra que nos puede dar el diagnóstico.

CONSIDERACIONES A LA TOMA DE MUESTRAS

- Las torundas son recomendadas para el aislamiento de micobacterias, por la cantidad limitada de muestra. Estas sólo son aceptables cuando no pueden tomarse de otra manera. Por ello, el resultado negativo de estas muestras enviadas en torundas no son fiables.

- La cantidad insuficiente de muestra podría suponer un resultado de cultivo falso negativo.

- Es importante notificar al clínico lo antes posible que la muestra es inadecuada y el porqué. También debe explicarse qué muestras son las aceptadas en esa situación clínica.

- En el agua y otros fluidos, puede existir micobacterias viables que forman parte de la flora normal microbiota. Las contaminaciones por estas micobacterias saprófitas pueden producir cultivos y/o microscopias falsamente positivas. Micobacterias saprófitas pueden aislarse también de los lavados gástricos u otros orígenes humanos.

- Las muestras obtenidas inicialmente después de la implantación de una terapia antimicrobiana puede producir resultados falsamente negativos.

5.2.- CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

1.- El transporte rápido de las muestras al laboratorio es fundamental.

2.- La conservación deberá hacerse a 4°C siempre que sea posible.

3.- Algunas muestras como esputos, sangre o heces pueden en caso necesario ser enviadas sin refrigeración. Los esputos consecutivos de tres días pueden por necesidades operativas almacenarse en frigorífico a 4°C y llevarse al laboratorio los tres juntos el último día

6.- DIAGNÓSTICO DE MUESTRAS CLÍNICAS

6.1.- VISUALIZACIÓN. MICROSCOPIA

El hallazgo de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en extensiones teñidas y examinadas al microscopio es la primera evidencia de la presencia de micobacterias en una muestra clínica. Es el procedimiento más fácil y rápido que se puede efectuar y que aporta al clínico una orientación preliminar del diagnóstico.

La visualización de BAAR en esputo no es afirmativa de *M. tuberculosis* porque otras micobacterias pueden también causar enfermedad pulmonar. Sin embargo, una baciloscopia positiva en conjunción con la clínica y hallazgos radiológicos puede utilizarse para un diagnóstico presuntivo de micobacteriosis.

Algunas micobacterias pueden aparecer como Gram positivas en forma de bacilos diferimorfos en la tinción de Gram. Algunos otros grupos de microorganismos comparten la característica de ácido alcohol resistencia parcial como especies de *Nocardia*, *Legionella*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* y algunos parásitos como *Cryptosporidium*, *Isopora belli* y *Cyclospora*. Estos microorganismos con propiedad de ácido resistencia son generalmente menos estables que las micobacterias y requieren de una decoloración más ligera para ser positivos.

Las baciloscopias pueden prepararse directamente de la muestra clínica o después de que ésta haya sido descontaminada y concentrada para la realización del cultivo. Esto aumenta ligeramente la sensibilidad de la técnica.

La técnica clásica de Ziehl-Neelsen o sus variantes y la tinción con fluorocromos (auramina) son igualmente eficaces y se basan en el mismo principio. La mayor rapidez de la fluorescencia es la razón por lo que ésta justificada en aquellos laboratorios que realizan más de diez exámenes microscópicos al día.

Algunos laboratorios confirman la tinción positiva de fluorescencia con el Ziehl-Neelsen. Alrededor del 30% de las micobacterias de crecimiento rápido pueden ser fluorescencia negativa y requieren de la tinción de Ziehl-Neelsen para su detección. Ante la sospecha de una infección conocida o en potencia de enfermedad por micobacterias de crecimiento rápido debe realizarse en esas muestras directamente una tinción de Ziehl-Neelsen.

En los casos en que la morfología de los bacilos encontrados por la técnica de fluorocromo es cuestionable, la tinción debe ser repetida por el método de Ziehl-Neelsen. Esta medida es importante para disminuir la probabilidad de resultados falsos positivos.

Todas las características morfológicas por visualización pueden ser consideradas, pero no se

pueden establecer diferencias entre las distintas especies con un alto grado de certeza hasta que no sea probado mediante cultivo, e identificación.

- La no observación de BAAR en una muestra clínica no descarta el diagnóstico de tuberculosis, ya que es una técnica de sensibilidad limitada.

Se ha demostrado que son necesarios de 5.000 a 10.000 bacilos por ml de esputo para el reconocimiento en la microscopio directa, en estos casos el cultivo detecta de 10 a 100 colonias de micobacterias viables.

Todas las muestras, deberían ser procesadas rutinariamente para microscopía y cultivo.

La interpretación de baciloscopia de heces, sangre y médula ósea es problemática. Estas muestras con frecuencia son difíciles de interpretar por la gran cantidad de material celular presente.

- Los resultados del examen microscópico deben expresarse en número aproximado de bacilos visualizados. Existen diversas formas de expresarlos. La reducción del número de bacilos emitidos por el enfermo orienta sobre la eficacia del tratamiento siempre que se acompañe de una mejoría de sus síntomas clínicos.

- La sensibilidad de la baciloscopia depende, en gran parte, de una buena preparación de la tinción y de la lectura, se han documentado sensibilidades desde un 20 a un 80%, dependiendo de donde se haya hecho el estudio y del tipo de muestras estudiadas.

- Los estudios muestran que el factor crítico para evaluar la validez de la tinción está en función del número de colonias que crece en el cultivo.

- Existen una serie de puntos que hay que tener en cuenta ante una baciloscopia.

Los falsos positivos en el laboratorio se pueden provocar:

- Por contaminación de la preparación con micobacterias saprófitas como *M. gordonae* presentes en el grifo o en el agua destilada utilizada durante el procesamiento o manipulación de la tinción.

- Por contaminación cruzada de una baciloscopia positiva a negativa debido a la unión o proximidad entre las preparaciones. El uso apropiado de controles de baciloscopia en cada tanda de tinciones podría reducir considerablemente los falsos positivos.

Cuando los pacientes bacilíferos son tratados con regímenes de primera elección suelen negativizar sus esputos a partir de las 2-3 semanas de tratamiento. No obstante, en algunos pacientes se negativiza antes el cultivo que la baciloscopia, esto es debido a que los bacilos que se siguen eliminado están lo suficientemente lesionados por el tratamiento que nos capaces de desarrollarse en los cultivos. Esto da lugar a lo que se llaman "falsos positivos" con cultivo negativo o "bacilos inviables". A pesar de la baciloscopia positiva

estos pacientes no suelen tener capacidad contagiante.

Los falsos negativos suelen ser el resultado de extensiones demasiado finas o rápidas en la visualización.

Control de calidad

Las suspensiones utilizadas para el control de calidad deben prepararse en aproximadamente 1 ml de suero salino o agua destilada con una turbidez nº 1 de McFarland de *Nocardia asteroides* (control negativo) y *Mycobacterium tuberculosis*, H37Ra ATCC 25177 (control positivo). También pueden utilizarse como controles otros microorganismos como *E. coli* o *M. kansasii*.

No deben utilizarse micobacterias de crecimiento rápido, puesto que muestran una capacidad inconstante para retener las tinciones ácido alcohol resistentes.

6.2.- DIGESTIÓN Y DESCONTAMINACIÓN

Es necesario eliminar de las muestras los microorganismos contaminantes que interfieren en el desarrollo de las micobacterias. También es importante conseguir la licuefacción de los restos orgánicos (tejidos, moco y otros materiales) que rodean a los microorganismos, para que los agentes descontaminantes puedan destruir las bacterias no deseadas. Las micobacterias son más resistentes a los ácidos y bases fuertes que otros microorganismos, lo que permite utilizar con éxito estas técnicas de digestión-descontaminación. Pero si éstas no se utilizan adecuadamente pueden afectar, también la viabilidad de las micobacterias presentes en la muestra y dar lugar a falsos cultivos negativos (por exceso de descontaminación) o a un número elevado de contaminaciones (por defecto de descontaminación).

Para muestras de lugares estériles (LCR, L. peritoneal, tejidos, etc.), puede no ser necesaria la descontaminación previa. Sin embargo estas muestras deben ser concentradas para optimizar el aislamiento del microorganismo.

Los métodos de digestión - descontaminación más utilizados en la actualidad son los de Petroff, Tacquet y Ticcson, Kubica modificado por Krasnow y N-acetil-L cisteína-Hidróxido Sódico (NALC-NaOH). La elección de cualquiera de estos métodos dependerá del tipo de muestras que se descontamine y, sobre todo, de la utilización de determinados medios de cultivo líquidos y realización de técnicas moleculares a partir del sedimento de las muestras descontaminadas, ya que algunos reactivos utilizados en estos métodos pueden retrasar el crecimiento de las micobacterias o interferir en las reacciones de amplificación.

- La mayoría de los métodos de descontaminación requieren de una extrema atención al tiempo durante el cual la muestra está expuesta a la

descontaminación para evitar la muerte de las micobacterias.

- Usar siempre agua destilada estéril para todos los pasos del proceso con el fin de evitar contaminación con micobacterias.

- Evitar un exceso de agitación de la solución de NAOH-NALC, ya que la NALC es inestable en presencia de oxígeno.

- Si existe una población amplia de enfermos con fibrosis quística, debe considerarse el añadir ácido oxálico en el tratamiento de descontaminación para eliminar *P. aeruginosa* que pueden resistir al procesamiento de rutina.

- Un porcentaje de contaminación aceptado, para los medios sólidos está establecido entre el 3% y el 5%. Un índice de contaminación significativamente menor del 3% indica que la descontaminación es demasiado fuerte. Un rango significativamente mayor del 5% sugiere un proceso de descontaminación demasiado suave o de digestión incompleta.

En el índice de contaminación en los medios líquidos existe un margen variable de resultados dependiendo del sistema utilizado y de los autores.

6.3.- CULTIVOS

Todas las muestras clínicas sospechosas de contener micobacterias se deben sembrar en medios de cultivo adecuados por las siguientes razones:

1.- Los cultivos son mucho más sensibles que los exámenes microscópicos, pudiendo detectar una cantidad tan pequeña como 10 bacterias por ml. de muestra clínica digerida y concentrada.

2.- Los aislamientos en cultivo puro son necesarios normalmente para poder identificar las especies de las cepas aisladas.

3.- Si la baciloscopia es un índice de la eficacia del tratamiento, el cultivo permite asegurar la negativización y curación del paciente.

6.3.1.- MEDIOS SÓLIDOS

El método tradicional de cultivo para micobacterias incluye la inoculación de varios medios sólidos o líquidos con y sin antibióticos. Un medio con base de huevo como el Lowenstein-Jensen es el más conocido. También los medios sin base de huevo como el Middlebrook 7H10 y 7H11.

6.3.2.- MEDIOS LÍQUIDOS

Los medios líquidos suponen un mejor crecimiento de las micobacterias, y en la actualidad se recomienda el cultivo primario de todas las muestras en medios líquidos.

6.3.2.1.- METODOS LÍQUIDOS DE LECTURA MANUAL

El sistema Septi-Chek MB (Becton Dickinson) consiste en un medio bifásico de 20 ml. de caldo Middlebrook 7H9, enriquecido con CO₂, suplementando con factores de crecimiento y antibióticos, al que se le acopla en el parte superior después de la inoculación de la muestra un dispositivo. Este dispositivo tiene tres medios de cultivo, por un lado un agar Middlebrook 7H11 no selectivo, que permite el crecimiento de la mayoría de las micobacterias y, por otro lado, dos secciones, una con un medio modificado de Lowenstein-Jensen, y otra con agar chocolate para detectar contaminaciones. El medio líquido es invertido sobre la fase sólida inicialmente y a intervalos durante la incubación. El sistema se revisa visualmente. El crecimiento se detecta tanto en el medio líquido como en la fase sólida.

Ofrece la posibilidad de disponer un crecimiento sobre la fase sólida que puede utilizarse para practicar pruebas de identificación sin necesidad de realizar resiembras adicionales, y además facilita la detección de cultivos mixtos.

Los principales inconvenientes del MBSepti-Check son la lentitud en la detección del crecimiento con respecto al sistema BACTEC 460 TB, no permite realizar estudios de sensibilidad *in vitro* y falla con frecuencia el sistema de identificación presuntiva de tuberculosis que lleva incorporado en su fase sólida.

El medio de cultivo Mycobacterial Growth Indicador Tube (MGIT) (Becton Dickinson), utiliza también un caldo de Middlebrook 7H9 al que se incorpora un sensor fluorescente sensible al O₂ formado por un compuesto de rutenio pentahidratado sobre una base de silicona. A medida que se produce crecimiento bacteriano se consume O₂ y esto permite observar fluorescencia en el tubo mediante el uso de un transiluminador de luz ultravioleta de 362 nm. Este medio en la actualidad está automatizado.

Este medio MGIT, presenta falsos positivos. Tubos en los cuales existe fluorescencia pero en los que la baciloscopia y el cultivo son negativos para *Mycobacterium sp.* El número de estos falsos positivos podría disminuir con la experiencia. Actualmente, existen limitaciones en la realización directa de sondas de identificación y antibiogramas, que, en un futuro, podrían solucionarse.

6.3.2.2.- MEDIOS LÍQUIDOS DE LECTURA SEMIAUTOMÁTICA

El sistema BACTEC 460TB, es el más ampliamente evaluado, utiliza el medio de cultivo líquido Middlebrook 7H12 y como sustrato ácido palmítico marcado con C₁₄. Durante el crecimiento bacteriano se produce 14CO₂, que es detectado por el sistema y lo traduce en índice de crecimiento. Este sistema utiliza reactivos radiactivos, es semiautomatizado y requiere de una amplia manipulación de los viales a lo largo de todo el período de incubación.

En la actualidad, se están evaluando varios métodos automatizados para el cultivo de *Mycobacterium sp.* en medio líquido, todos ellos adaptados de los sistemas automáticos de hemocultivos, utilizando medios de cultivos apropiados y sistemas capaces de detectar micobacterias de muestras clínicas.

6.3.2.3.- MEDIOS LÍQUIDOS DE LECTURA AUTOMÁTICA

Sistema ESP, utiliza un vial conteniendo el medio líquido 7H9 modificado suplementado con OADC para el enriquecimiento. Cada vial lleva incorporado una esponja de celulosa que permite una mayor área de superficie para el crecimiento de la micobacteria. El sistema puede detectar micobacterias de esputos, sangre, heces, jugo gástrico... etc, basándose en una medida monométrica de consumo de oxígeno.

El sistema MB/Bact, utiliza el medio líquido Middlebrook 7H9 modificado. Cada botella lleva incorporada en la base un sensor colorimétrico que detecta la presencia de CO₂ como indicador de crecimiento bacteriano. El cambio de color de verde a amarillo es monitorizado continuamente por un reflectómetro que se halla en la unidad de detección. Estos valores medidos cada 10 minutos son transmitidos a un ordenador, que basándose en un sofisticado algoritmo, indica que en el medio existe crecimiento bacteriano.

En estos sistemas se realiza la incubación y la lectura automáticamente. El sistema lo detecta como positivo o lo descarta como negativo, sin que se produzca ninguna manipulación desde que la botella es introducida en el sistema.

También se encuentra actualmente en desarrollo otro sistema MGIT 960, que automatiza el antiguo sistema manual.

6.3.2.4.- AISLAMIENTO DE ESPECIES CON CARACTERÍSTICAS ESPECIALES

El aislamiento de *M. haemophilum* de pacientes necesita medios que contengan hemina. Cuando exista sospecha estas muestras pueden ser inoculadas en medios con un 1% de citrato férrico amónico. *Mycobacterium haemophilum* crece mejor a 30-32°C.

Se recomienda que los cultivos de sangre para micobacterias sean inoculados en BACTEC 1.3A e incubados al menos durante 8 semanas, para el aislamiento de *M. genavense* en pacientes con SIDA.

Hay que tener en cuenta las especies que necesitan temperaturas de crecimiento inferiores o superiores a 37° como *M. marinum* y *M. thermoresistibile*.

CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad para los medios de cultivo es necesario para distinguir entre la contaminación del medio o de sus ingredientes y el correspondiente a la muestra de enfermo.

Los microorganismos utilizados para el control de calidad de los medios de cultivo son *M. tuberculosis* H37Ra, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. scrofulaceum* ATCC 19981, *M. intracelulare* ATCC 13950 y *M. fortuitum* ATCC 6841. Todas estas cepas deben crecer en los medios para micobacterias, debiendo ser la incubación la misma que para las muestras de los pacientes, durante más de 21 días a 35-37° C, en una atmósfera de CO₂ de 5 a 10%. La cepa control *E. coli* ATCC 25922 debe mostrar inhibición total o parcial en los medios selectivos de micobacterias.

6.4. TÉCNICAS GENÉTICAS

Técnicas de detección e identificación. En los últimos años se han desarrollado técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos con las que se intenta conseguir la detección a la vez que la identificación de *M. tuberculosis* directamente de muestras clínicas. Algunas se encuentran ya comercializadas, siendo las más utilizadas TB Amplicor-Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PCR test (Roche), *M. Mycobacterium tuberculosis* Direct test (MTDT) (GenProbe) y LCX *Mycobacterium tuberculosis* assay (Abbot).

7. PROCESOS DE IDENTIFICACIÓN.

Actualmente se recomienda que todos los aislamientos de micobacterias sean identificados a nivel de especie, debido a la posibilidad de que múltiples especies de micobacterias no tuberculosas se comporten como patógenos para el hombre.

Durante muchos años la identificación de las micobacterias se ha llevado a cabo en base a las características fenotípicas (velocidad de crecimiento, morfología de las colonias, etc) y a pruebas bioquímicas. En la actualidad, la necesidad de identificar cada vez mayor número de aislados diferentes a *M. tuberculosis* y la importancia de un diagnóstico precoz han motivado el desarrollo de nuevas técnicas en la identificación de las micobacterias. En la actualidad, las técnicas disponibles para la identificación de micobacterias pueden resumirse en bacteriológicas (características fenotípicas), bioquímicas, técnicas genéticas o de microbiología molecular y otras, que incluyen la cromatografía de lípidos.

7.1.- MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS

Se trata de métodos que permiten la mayoría de las veces asignar las micobacterias a un subgrupo. Esto permite seleccionar las pruebas bioquímicas u otros métodos para su ulterior identificación a nivel de especies.

7.1.1.- TINCIÓN DE ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENCIA

El primer paso en la identificación de una micobacteria es confirmar que el aislado pertenece al género *Mycobacterium*.

7.1.2.- VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

Se refiere al número de días necesarios para la presencia de colonias visibles en subcultivo. En función de la velocidad de crecimiento se dividen a las micobacterias en dos grandes grupos:

- Micobacterias de crecimiento rápido: las colonias aparecen en menos de 7 días en medio sólido.
- Micobacterias de crecimiento lento: las colonias tardan más de 7 días en aparecer, en medio sólido.

El número de días en los que han aparecido las colonias del cultivo primario es sólo orientativo.

En aquellos casos en los que existan dudas acerca de si un aislado es rápido o lento crecedor, se pueden realizar varias diluciones seriadas de la cepa aislada (la velocidad de crecimiento puede estar influida por el efecto inóculo) y subcultivarlas a distintas temperaturas (la velocidad de crecimiento puede estar también influida por la temperatura de incubación).

7.1.3.- TEMPERATURA DE CRECIMIENTO.

La mayoría de las micobacterias crecen bien a 37°C. Sin embargo, hay micobacterias que requieren temperaturas inferiores de crecimiento, (*M. marinum*, *M. ulcerans* y *M. haemophilum* crecen a 30°C) y otras que pueden crecer a distintas temperaturas lo cual orienta en su identificación (*M. thermoresistibile* es capaz de crecer a 52°C y *M. xenopi* a 42°C).

7.1.4.- MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS.

La morfología de las colonias puede ser también bastante orientativa. Puede observarse la morfología de las colonias crecidas directamente en Lowestein-Jensen y distinguirse si son colonias lisas, rugosas o mucosas. Pueden también observarse morfológicamente las microcolonias, según el método de Runyon (observación microscópica de las colonias a los 15 días del subcultivo en un medio transparente, Middiebrook 7H10).

7.1.5.- PIGMENTACIÓN Y FOTOACTIVIDAD.

La pigmentación que presentan las colonias de algunas especies de micobacterias, se debe a la producción de pigmentos carotenos. Atendiendo a la pigmentación de micobacterias se dividen en tres grandes grupos:

- *Fotocromógenas*.- Producen colonias no pigmentadas cuando crecen en la oscuridad y dichas colonias se pigmentan con la luz. La forma de inducir esta propiedad se llama fotoinducción y se consigue exponiendo las colonias a la luz de una lámpara de 40W durante 60 minutos, tras lo cual se vuelve a incubar normalmente. Si las colonias se pigmentan, la cepa presenta fotoinducción y es fotocromógena.

- *Escotocromógenas*: Producen colonias pigmentadas cuando crecen, tanto expuestas a la luz como en la oscuridad. Para comprobar que la cepa es realmente escotocromógena es necesario hacer un subcultivo cubriendo el tubo con papel negro. La pigmentación puede ser de tres tipos y permite distinguir las especies: pigmento rosa o rojo (*M. lactis*), pigmento amarillo-naranja (*M. gordonae*) y pigmento irregular *M. xenopi*

- *No cromógenas*: las colonias no se pigmentan en la oscuridad ni en la luz.

Los patrones de pigmentación deben evaluarse muy cuidadosamente, teniendo en cuenta que pueden presentarse variaciones dentro de las especies (algunas cepas de *M. avium*, generalmente no cromógenas, con el tiempo pueden dar pigmentación irregular) y en función de la temperatura de incubación (*M. szulgai* es fotocromógeno a 25°C y no cromógeno a 35°C). Por este motivo, todas las micobacterias escomógenas y no escotocromógenas deben someterse siempre a la prueba de la fotoinducción y hacerlo a distintas temperaturas.

Con estos métodos bacteriológicos simples pueden clasificarse las micobacterias más

frecuentemente aisladas en las muestras clínicas en subgrupos, a los que luego podrán aplicarse otros métodos para su definitiva identificación a nivel de especies. Las tablas 3 y 4 agrupan las especies en función de las características mencionadas anteriormente.

En el grupo de micobacterias de crecimiento lento no cromógenas se han incluido recientemente dos nuevas especies como causantes de infecciones diseminadas en pacientes con depresión de la inmunidad celular *M. celatum* y *M. conspicuum*, *M. celatum* tiene las mismas características morfológicas que *M. avium* complex, con el que puede confundirse. Otra especie de micobacteria descrita en los últimos años causante de infección diseminada es *M. genavense*, que no suele crecer en los medios sólidos habituales por lo que se desconoce sus características fenotípicas.

7.2.- MÉTODOS BIOQUÍMICOS

Estos métodos son los que tradicionalmente se han venido usando para identificar a las micobacterias. La descripción detallada de cada una de las pruebas, materiales y reactivos necesarios para su realización pueden encontrarse en distintos manuales.

Dentro de las pruebas bioquímicas las más usuales son:

7.2.1.- PRUEBA DE LA NIACINA.

Pone de manifiesto la capacidad para producir ácido nicotínico. Es una prueba fundamental en la identificación de *M. tuberculosis*, aunque la identificación no debe basarse nunca exclusivamente en esta prueba, ya que hay cepas de *M. simiae* y *M. bovis* BCG que también pueden ser niacina positivo. La prueba de la niacina debe acompañarse siempre de la reducción de los nitratos y la actividad catalasa a 68°C.

Es muy importante en la realización de la prueba que el cultivo sea abundante y puro. Existen tiras de papel comercializadas que facilitan la realización de la técnica.

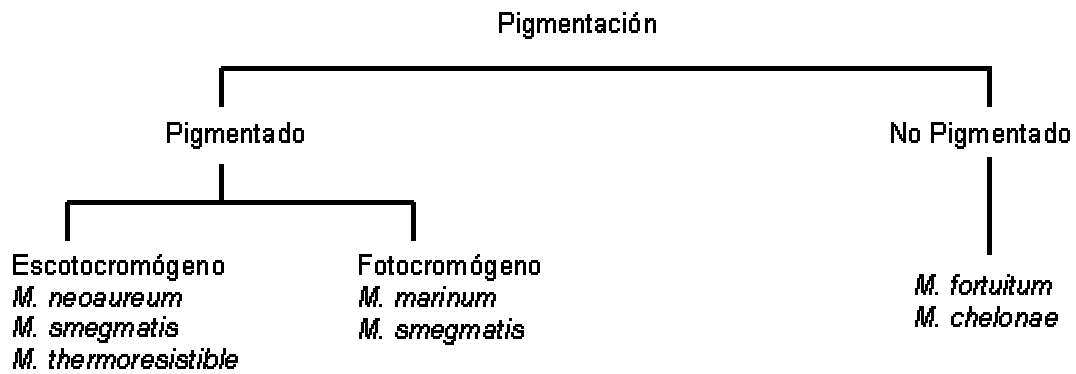
7.2.2.- PRUEBA DE LA REDUCCIÓN DE LOS NITRATOS.

Al igual que la prueba de la niacina, es una prueba básica.

7.2.3.- PRUEBA DE LA HIDROLISIS DEL TWEEN 80.

Pone de manifiesto la capacidad de las micobacterias para liberar ácido oleico contenido en el Tween 80.

Tabla 3. Identificación de micobacterias de crecimiento rápido



Prueba	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. thermoresistible</i>
Arilsulfatasa (3días)	+	+	-	-	+/-	-
Crecimiento en MCK	+	+	+	-	-	-
Catalasa >45 mm	+	+	-	+	+/-	+
Citrato Férrico amoniacal	+	-				

Tabla 4. Identificación de lentos crecedores fotocromógenos

Prueba	<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. asiaticum</i>
Crecimiento 28°C	>7días	<7días	>7días
Crecimiento 45°C	-	-	+
Reducción Nitratos	+	-	-

7.2.4.- PRUEBA DE LA ARILSULFATASA.

Pone de manifiesto si la micobacteria posee esta enzima. La prueba tiene dos variantes según la lectura se haga a los 3 días (para rápidos crecedores) o a las dos semanas (para lentos crecedores).

7.2.5.- PRUEBA DE LA CATALASA.

Todas las micobacterias, excepto *M. gastri*, algunas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* resistentes a la isoniacida y cepas de *M. kansasii* resistentes a la isoniacida, poseen actividad catalasa. La prueba tiene dos variantes:

- Catalasa semicuantitativa: se mide el tamaño de la columna de burbujas.

-Estabilidad de la actividad catalasa a 68°C algunas micobacterias pierden la actividad catalasa tras el calentamiento a 68°C. En este

grupo se incluyen *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. gastri* y *M. haemophilum*.

7.2.6.- PRUEBA DE LA RESISTENCIA A LA TCH (HIDRACÍDA DEL ÁCIDO 2-TIOFENOCARBOXÍLICO).

Consiste en observar crecimiento o inhibición de las micobacterias frente a este compuesto. Permite diferenciar *M. bovis*, cuyo crecimiento se inhibe, de *M. tuberculosis*, resistente a dicho compuesto.

7.2.7.- CRECIMIENTO EN AGAR MACCONKEY SIN CRISTAL VIOLETA.

Es una prueba útil en la identificación de rápidos crecedores. Las especies patógenas, *M. fortuitum* y *M. chelonae*, crecen en este medio, el resto de las especies de rápidos crecedores no lo hacen excepto algunas cepas de *M. smegmatis* que pueden crecer.

Tabla 5. Identificación de lentos crecedores escotocromógenos

Prueba	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. flavescens</i>
Reducción nitratos	-	-	-	-/+	--	+	+
Tween 80 (5dlas)	-	+	-	-	-	-	+
Tween 80 (10dlas)	-	+	-	-	-	+	+
Arilsulfatasa (3dlas)	-	-	+(42°C)	-	-	-	+/-
Crecimiento 30°C	+	+	-/+	+	+	+	+
Crecimiento 45°C	-	-	+	-	-	-	-
Catalasa>45mm	+	+	-	+	-	+	+

7.2.8.- PRUEBA DE LA REDUCCIÓN DEL TELURITO POTÁSICO.

Es útil para la identificación de las cepas del complejo MAC.

Otras pruebas bioquímicas que pueden ayudar a la identificación de los aislados de micobacterias son,.

- La transformación del citrato férrico amoniacal, diferencia *M. fortuitum* de *M. chelonae*.
- Tolerancia al cloruro sódico solo *M. triviale* crece en medios conteniendo 5% de NaCl.
- Ureasa: diferencia cepas pigmentadas de MAC, ureasa negativa.
- NAP: compuesto que inhibe a las micobacterias del complejo tuberculosis y que se utiliza en el sistema BACTEC radiométrico y en el Septi-check.

El principal inconveniente de las pruebas bioquímicas es que además de ser muy laboriosas, son muy lentas. A estos inconvenientes se suma además la variabilidad de las reacciones incluso entre cepas de una misma especie. Las tablas 5 a 8 expresan la identificación bioquímica de los diferentes grupos de micobacterias.

7.3.- MÉTODOS GENÉTICOS DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR.

La principal ventaja que aportan estos métodos es la rapidez en la identificación, ya que son técnicas para las que no se requieren subcultivos la mayoría de las veces pueden llevarse a cabo directamente en el cultivo primario. Como ventaja adicional, los métodos genéticos pueden aplicarse también directamente a los cultivos en medios líquidos (BACTEC radiométrico y nuevos medios), lo que acelera aun más los resultados. Las técnicas disponibles mas usadas actualmente son:

Tabla 6. Identificación de no cromógenos de crecimiento lento

Especie	Niacina	Reducción de nitratos	Hidrolisis Tween 80	Catalasa 68°C	THC	Ureasa	Crecimiento en PZA
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+/-	-	+	+/-	-
<i>M. bovis</i> ²	-	-	-	-	-	+	+
<i>M. bovis BCG</i> ²	-	+	+/-	-	-	+	+
<i>M. africanun</i>	-	-	-	-	v	+	-
<i>M. avium complex</i> ¹	-	-	-	+	+	-	+
<i>M. malmoense</i>	-	-	+	-	+	+/-	+
<i>M. gastri</i>	-	-	+	-	+	v	+
<i>M. triviale</i> ¹	-	+	+	+	+	+/-	+
<i>M. haemophilum</i> ³	-	-	-	-	nd	-	nd
<i>M. xenopi</i>	-	-	-	+	+	-	+
<i>M. shimoidei</i>	-	-	+		+	-	+
<i>M. celatum</i>	-	-	-	+	+	-	nd
<i>M. conspicuum</i>	-	-	+	>1cm	+	-	-

nd: no disponible

1. *M. terrae* y *M. triviale* pueden diferenciarse por la tolerancia a 5% de NaCl

2. *M. bovis* puede diferenciarse de *M. bovis BCG* por ser resistente a 30 µg de cicloserina y *M. bovis* es sensible

3. *M. haemophilum* necesita hemina o citrato amónico férrico para su crecimiento.

7.3.1.- SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Se basan en el uso de sondas de ADN marcadas con ésteres de acridina (químioluminiscencia) y complementarias a fragmentos de rARN específicos de especie. Actualmente se encuentran disponibles sondas comerciales (AccuProbe) para la identificación de las siguientes especies *M. tuberculosis* complex: El principal inconveniente es que no diferencia entre las especies de este complejo. Se han descrito casos de falsos positivos con *M. terrae* y *M. celatum*.

- *M. avium* complex: Puede dar falsos negativos con algunas cepas, que presumiblemente pueden obviarse cuando se utilizan las sondas específicas de *M. avium*

- *M. intracellulare*

- *M. goodnae*

- *M. kansasii*

Las sondas de ácidos nucleicos son muy sensibles cuando se utilizan a partir de cultivos en medios sólidos. En cultivos en BACTEC, los mejores resultados en este caso se obtienen cuando el índice de crecimiento es muy alto (500-900), por lo que se recomienda su uso cuando se comprueba que el índice ha alcanzado valores altos que se estabilizan. En el caso de los hemocultivos inoculados en el sistema BACTEC radiométrico la presencia de sangre en la muestra puede causar problemas de falsos positivos. Pueden solucionarse diluyendo la muestra con líquido del mismo vial y tratarla con SDS o bien esperando al subcultivo en medio sólido.

No existen todavía demasiados datos acerca del uso de las sondas con los medios líquidos actuales no radiométricos para el cultivo de micobacterias, aunque ya se han comunicado algunos resultados válidos.

7.3.2.- SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Se basa en la amplificación y posterior secuenciación de un fragmento del gen 16S rARN, de secuencia conocida en las distintas especies de micobacterias. Este gen está bastante conservado, pero tiene zonas variables con secuencias de nucleótidos que son específicas de género y de especie y que son las que se amplifican. Actualmente ésta es considerada por muchos autores como la técnica que permite la mejor identificación de los aislados de micobacterias. Sin embargo, no es aplicable como rutina asistencial en los laboratorios de microbiología diagnóstica dada la necesidad de una tecnología no disponible en la mayoría de ellos. Su uso se limita por el momento a laboratorios con experiencia.

7.3.3.- POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (PRA).

Consiste en la amplificación de un fragmento del gen que codifica la proteína 65K de las micobacterias y en la posterior digestión del

fragmento por dos enzimas de restricción, HaeIII y BstEII. Los patrones de restricción son específicos en las distintas especies de micobacterias. La técnica tiene muchas ventajas: necesidad de poco inóculo, rapidez y capacidad de identificar la mayoría de las especies descritas. Entre los inconvenientes se encuentra la necesidad de disponer de los materiales necesarios para amplificación y electroforesis de geles de agarosa, así como el adiestramiento de geles de agarosa, así como el adiestramiento en la lectura e interpretación de los patrones.

7.3.4.- TÉCNICAS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN.

Se han comentado en el apartado 6.4.

7.4.- OTROS METODOS.

7.4.1.- CROMATOGRAFÍA

Se trata de técnicas con las que se estudian la composición de lípidos de la pared celular de las micobacterias. Existen tres tipos de cromatografía que se han aplicado a la identificación de las micobacterias- la cromatografía de capa fina, la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). De ellas, la cromatografía de gases y la HPLC son las que mejores resultados han dado. Se trata de técnicas muy rápidas (aportan resultados en menos de 2 horas) y que dan muy buenos resultados en la identificación. Tienen como inconveniente que el equipo que requieren es caro, por lo que actualmente están siendo utilizadas en laboratorios de Referencia.

En la cromatografía de gases, la identificación se basa en el perfil de ácidos grasos de las micobacterias. Permite la identificación de prácticamente todas las especies de micobacterias descritas y se realiza en unas pocas horas. Existe comercializado un sistema que incluye además del cromatógrafo, el equipo informático además del cromatógrafo, el equipo informático necesario para la interpretación de los patrones.

Por su parte, la HPLC se basa en el perfil de ácidos micólicos. Requiere muy poco inóculo y la identificación puede llevarse a cabo tan pronto como las colonias son visibles.

Técnicamente es sencilla y rápida. La interpretación de los patrones obtenidos se ha facilitado por la existencia de programas informáticos que permitan la comparación de los patrones de ácidos micólicos con los de una colección de 45 especies de micobacterias que comprenden las más habituales en clínica humana.

8.- ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

8.1.- DETECCIÓN DE RESISTENCIAS DE *M. TUBERCULOSIS*.

8.1.1.- INTRODUCCIÓN

En el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* se producen mutaciones espontáneas, que dan lugar a resistencias a los antibióticos, este tipo de resistencias suelen ser a un solo fármaco y su frecuencia es baja. En la población bacilar de un enfermo tuberculoso, pueden existir bacilos con este tipo de mutaciones junto a bacilos sensibles. La quimioterapia elimina los bacilos sensibles y permite el desarrollo de los bacilos resistentes, por lo que el tratamiento de la tuberculosis se basa en la asociación de fármacos para evitar la aparición de este tipo de resistencias. La existencia de tuberculosis resistente y sobre todo de tuberculosis multiresistente en un producto de la actuación humana. Las pruebas de sensibilidad en el laboratorio detectan, de forma aislada para cada fármaco, el porcentaje elevado de bacilos resistentes en la población tuberculosa del enfermo.

8.1.2.- FINALIDAD DE LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA

La realización de pruebas de sensibilidad tiene dos vertientes, un aspecto individualizado en un paciente tuberculoso y un segundo aspecto epidemiológico para conocer el porcentaje de cepas resistentes circulantes en una población.

Las implicaciones epidemiológicas van desde el tratamiento sistemático con 3 ó 4 fármacos, al conocimiento de grupos de riesgo por mal cumplimiento del tratamiento o la evaluación de la eficacia de los programas contra la tuberculosis.

8.1.2.1.-Criterios para realizar las pruebas de sensibilidad en un paciente.

En la literatura existen diferentes indicaciones que son susceptibles de modificación atendiendo a circunstancias del mismo paciente o del área geográfica en que se trabaje, inicialmente el antibiograma sistemático no estaría indicado y debe realizarse básicamente en los siguientes casos: 1) sospecha de que se trata de un paciente con resistencias, 2) persistencia de baciloscopias positivas con posterioridad a los dos meses de la primera muestra, 3) persistencia de cultivo positivo a los seis meses del primer cultivo. Estos criterios se han ampliado para: 4) todos los pacientes con VIH en zonas donde la incidencia de VIH es elevada, para realizar una vigilancia activa sobre este grupo y 5) todos los pacientes menores de 15 años.

8.1.2.2.- Realización de pruebas de sensibilidad con fines epidemiológicos.

La vigilancia y control de cepas resistentes es un proceso que requiere planificación previa y la

colaboración de clínicos, epidemiológicos y microbiológicos.

Los datos publicados sobre resistencias de *M. tuberculosis* pueden no ser comparables porque las definiciones de los tipos de resistencia, los cálculos de las mismas o las poblaciones incluidas son distintas. Asimismo, la metodología utilizada para las pruebas de sensibilidad puede ser también causa de diferencias.

8.1.3.- DEFINICIÓN DE RESISTENCIAS

Resistencia primaria. Se define como resistencia primaria (RP) la presencia de resistencia a uno o más fármacos antituberculosos en un nuevo paciente tuberculoso. Incluye los pacientes que nunca han recibido tratamiento y aquellos en los que por diversos motivos se ignora si han recibido tratamiento anterior. Esta definición incluye las resistencias adquiridas encubiertas (iniciales).

Resistencia adquirida. Se define como resistencia adquirida (RA) la resistencia a uno o más fármacos antituberculosos en pacientes que han recibido tratamiento previo durante un mes o más.

La definición de resistencia múltiple o multiresistencia (MR) incluye las cepas con resistencia al menos a isoniazida (H) y rifampicina ya sea inicial o adquirida.

Cálculo de la resistencia inicial y adquirida.

La RP se calcula con un cociente en cuyo numerador está el número de pacientes con resistencia que no han recibido tratamiento anterior dividido por el número de pacientes que inician tratamiento. La RA se calcula con el número de pacientes con resistencia y que han realizado anteriormente tratamiento dividido por los pacientes que inician tratamiento pero refieren tratamientos previos.

8.1.4.- MÉTODOS DE SENSIBILIDAD PARA *M. TUBERCULOSIS*.

Los diversos métodos descritos para realizar pruebas de sensibilidad de *M. tuberculosis*, se pueden agrupar de la siguiente forma:

- 1.- Métodos de referencia (dependen de la observación de colonias crecidas).
- 2.- Métodos que detectan el crecimiento bacteriano por sistemas automatizados o semiautomatizados.
- 3.- Detección de alteraciones genómicas.
- 4.- Otros métodos en desarrollo.

8.1.4.1.- Métodos de referencia.

Como en cualquier otra técnica los resultados deben ser reproducibles, comparables entre laboratorios y correlacionar con la clínica. En diversas reuniones de la OMS entre 1961 y 1969 se aceptaron tres métodos para realizar estudios de sensibilidad de *M. tuberculosis*, que

actualmente siguen siendo los métodos de referencia.

El primero descrito por Michison en 1953 se conoce como método del cociente de resistencias, compara la concentración mínima inhibitorio de una cepa, con una cepa salvaje de referencia. El segundo es el método de concentraciones absolutas de Meisser descrito en 1961, donde se compara el número de colonias que crecen en el medio con el fármaco respecto al crecimiento obtenido en un medio sin fármacos. El tercero fue elaborado por Canetti y cols. en 1963 es el método de proporciones y diluciones múltiples que ha sido finalmente el más utilizado. La característica común a los tres es que incorporan el fármaco en medio sólido de Lówenstein-Jensen y que para su lectura es necesaria la visualización de colonias, por lo que dado el metabolismo lento de *M. tuberculosis* los resultados tardan de 21 a 28 días.

El principal problema radica en la escasa solubilidad del bacilo en medio acuoso, lo que hace difícil obtener una suspensión homogénea que permita un inóculo uniforme por esa razón, para la lectura se establece siempre una proporción o relación entre el crecimiento de la cepa problema en medio de cultivo sin antibiótico y el número de colonias obtenidas en el medio de cultivo con el fármaco investigado.

Al método de proporciones se han realizado varias modificaciones, como la utilización del medio liofilizado de Middlebrook 7H10 según el sistema del CDC, la versión del disco y la modificación de Heiffets utilizando Middlebrook 7H11 para las cepas que no crecen bien en Middlebrook 7H10. Estos métodos facilitan la labor en el laboratorio y la lectura. Los resultados pueden obtenerse en 15 a 21 días.

La dificultad al describir un nuevo método o sistema de antibiograma consiste en que deben redefinirse todos los parámetros del método, como son: el inóculo de bacilos, la concentración final de fármaco en función del medio que se vaya a usar y el tiempo idóneo de lectura, para que los resultados puedan ser comparables a los métodos de referencia clásicos.

8.1.4.2.- Sistemas semí o automatizados para detectar el crecimiento bacteriano.

Sistemas radiométricos (BACTEC 460 TB) La dependencia de esperar un crecimiento visible al ojo humano, se superó con la incorporación de estos métodos en el aislamiento de micobacterias, y su aplicación a la detección de resistencias. Este sistema detecta el crecimiento bacteriano mediante la utilización de un isótopo radiactivo incorporado a un medio líquido. En su inicio, al comparar los resultados obtenidos con las técnicas estándar se conseguía mayor coincidencia en las cepas sensibles que en las

resistentes. Con posterioridad se fueron ajustando las concentraciones de los fármacos que se debía incorporar al medio y actualmente se considera que las pruebas de sensibilidad para *M. tuberculosis* son reproducibles y sus resultados coincidentes con las técnicas en medios sólidos. El resultado puede darse entre los 5 a 10 días.

Sistemas no radiométricos. (ESP II, MB/Bact, MGIT) Con el fin de evitar la utilización de compuestos radiactivos se han desarrollado otros sistemas que en algunos casos incorporan la lectura automatizada. En el momento actual estos métodos están en fase avanzada de comprobación respecto a métodos de referencia. Los tiempos de lectura son similares al sistema radiométrico.

8.1.4.3.- Detección de genes de resistencia.

Estas técnicas son independientes del crecimiento bacteriano necesario en los métodos anteriormente citados. La utilización de técnicas de biología molecular al estudio de resistencias en micobacterias se iniciaron a principio de los años 90. La delección del gen *kanG*, que codifica la catalasa y peroxidasa se asocia a resistencias frente a isoniacida (H), al igual que el gen *inhA* que interviene en la síntesis de ácidos micólicos y el gen *aphC*. Mutaciones en el gen *rpoB* que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa, confiere la resistencia a rifampicina. La resistencia a estreptomycin se asocia a mutaciones en los genes *rpsL* y *rrs* que codifican la proteínas ribosómicas 12S y 16S rRNA. Para las resistencias a etambutol las alteraciones se han encontrado en el gen *embB* y el incremento de resistencia a fluoquinolonas se ha correlacionado con alteraciones en los genes *gyrA* y *gyrB* de la ADN girasa. Las alteraciones en determinados genes no se detectan en todas las cepas consideradas como resistentes con los métodos convencionales, por lo que es de suponer que debe haber mutaciones no conocidas en el genoma micobacteriano.

Para la detección de estas resistencias Telenti describió la técnica de PCR-single strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP) y en su experiencia la sensibilidad de este método es del 87% para la resistencia a H y superior al 96% para la resistencia a R.

Se ha comercializado un sistema para la detección de algunas mutaciones de resistencia a R (InnoLipa) de fácil realización y buena sensibilidad y especificidad aunque

requiere la infraestructura básica de un laboratorio de biología molecular. Las alteraciones genéticas también pueden detectarse por secuenciación o PCR heteroduplex. Estas determinaciones son laboriosas, deben ser realizadas en laboratorios de referencia y principalmente están enfocadas a estudios epidemiológicos.

8.1.4.4.- Otros métodos en desarrollo.

Con el fin de reducir el tiempo de detección de las resistencias se han descrito otros métodos que están en fase de evaluación y por el momento no aplicables a la utilización clínica: Estos métodos son:

Detección de adenosin-trifosfato (ATP) producido por los bacilos crecidos en medio líquido mediante bioluminiscencia.

Expresión de genes de luciferasa descrito por Jacobs, se basa en la utilización de un micobacteriofago portador de un gen de luciferasa que se incluye en el genoma de *M. tuberculosis* produciendo luz si hay un metabolismo activo, el desarrollo de esta técnica se basa en la mejora de vectores transportadores de los genes y de las proteínas productoras de luz.

Detección del ARN ribosómico micobacteriano mediante la utilización de sondas de hibridación de ADN marcado, este método, iniciado por Kawa con ADN-1125, se ha continuado por Miyamoto y Martín Casabona utilizando DNA marcado con compuestos quimioluminiscentes. **Citometría de flujo**, basada en la hidrólisis del diacetato de fluoresceína por el bacilo. Su detección por este método permite resultados a las 24 horas. En la actualidad supone un elevado costo.

Cromatografía. La cromatografía en medio líquido (HPLC), utilizada para identificación, también ha sido aplicada para pruebas de sensibilidad determinando las variaciones de los picos de ácidos micólicos producidos por un cultivo de *M. tuberculosis*, y estudiados en diferentes tiempos de incubación.

CMI en microplaca. Esta técnica se ha mejorado recientemente con la adición de determinados reactivos, indicadores de la oxidoreducción, como el azul alamar, o derivados del difeniltetrazolio.

8.2. DETECCIÓN DE RESISTENCIAS DE OTRAS MICOBACTERIAS.

8.2.1.- INTRODUCCIÓN

M. tuberculosis es una especie de sensibilidad constante, en la que las pruebas de sensibilidad han sido estandarizadas y correlacionadas con la eficacia terapéutica. En el caso de otras micobacterias las diferentes especies muestran amplia variabilidad en su sensibilidad a los antibióticos, además, no se ha conseguido la estandarización de los métodos y los estudios realizados no demuestran claramente una correlación clínica. En definitiva, no hay métodos estandarizados para estudios de sensibilidades, por lo que la única vía posible es utilizar métodos conocidos y establecidos en otros campos de la microbiología, como la concentración mínima inhibitoria (CMI) y comparar los resultados con las concentraciones alcanzables en sangre.

8.2.2.- MÉTODOS UTILIZADOS

8.2.2.1.- Micobacterias de crecimiento lento. Concentración mínima inhibitoria (CMI).

Pueden realizarse en medio sólido o líquido, Heifets indica, entre otras las siguientes ventajas del medio líquido:

- los resultados se obtienen en una semana en vez de las dos semanas que necesita el medio sólido;
- la absorción y degradación de la droga durante el tiempo de incubación es menor.
- los resultados obtenidos en medio líquido pueden ser comparados con parámetros farmacocinéticos.

Para realizar las MICs correctamente en medio líquido, es necesario: estandarizar el inóculo, el tiempo de lectura, la concentración de la droga en función del medio utilizado y realizar

contajes de colonias para conocer las ufc/ml en las diferentes concentraciones antibióticas. Toda esta metodología es cara, lenta, laboriosa y poco ágil en la práctica.

Sistemas simplificados para determinar la CMI.

Sistema radiactivo. El método ha sido utilizado frecuentemente en especies *M. avium complex* o *M. kansasii*, pero escasamente en otro tipo de micobacterias.

Microdilución en placa. Es más económico y de más fácil manipulación.

Gradiente de antibiótico en tira (Etest). Es un sistema comercializado. Su principal ventaja es su fácil realización.

8.2.2.2.- Micobacterias de crecimiento rápido.

M. fortuitum y *M. chelonae* son las especies más estudiadas, la información es escasa para otras especies de crecimiento rápido. Al igual que en las micobacterias de crecimiento lento se utilizan técnicas que determinen la CMI a los distintos antibióticos, la diferencia es que, en este caso, el medio de cultivo puede ser Mueller-Hinton suplementado.

Otros métodos: Dilución en agar y difusión disco con ambos métodos se ha obtenido una buena correlación con la CMI en el caso de *M. fortuitum*, pero la correlación es menor para *M. chelonae*.

Algunas técnicas como bioluminiscencia y citometría de flujo y sus variantes, referidas antes también han sido aplicadas al estudio de la sensibilidad de estas micobacterias.

9.- MARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS

La identificación de subgrupos de micobacterias basados en la rapidez de crecimiento, morfología de la colonia, pigmentación y diversas pruebas bioquímicas permiten clasificarlas pero desde el punto de vista epidemiológico se han empleado otros marcadores como el tipado de fagos, la sensibilidad a los antimicrobianos y la genética molecular.

9.1.- MARCADORES GENÉTICOS

La genética molecular es la herramienta actual más útil como marcador epidemiológico. La identificación de la secuencia repetitiva del DNA, que está presente en el genoma en número variables y localización, permite detectar diferencias entre cepas al dar un patrón altamente polimórfico usando enzimas de restricción. La mayoría de las aplicaciones epidemiológicas del análisis con enzimas de restricción (RFLP analysis) han usado una secuencia de inserción conocida como IS6110. En general, de 1 a 20 copias de la IS6110 se encuentran en el genoma de *M. tuberculosis*. La validez y utilidad de los marcadores genéticos, como el IS6110, depende de la estabilidad del patrón producido y de sus evoluciones durante el tiempo. La huella genética del DNA necesita, por otro lado, para ser específica se cepa evolucionar con el tiempo. En caso contrario todos los microorganismos tendrían el mismo patrón. El polimorfismo en la población de cepas de *M. tuberculosis* es esencial para que un sistema de huella genética sea válido. La clonalidad o identidad de cepa se demuestra de forma más convincente cuando hay una considerable diversidad de patrones. Una limitación del estudio de la huella genética (aparte del tiempo que consume y el coste) se da cuando hay pocas copias de IS6110. Esas

cepas deben ser tipadas usando otro sistema de estudio como el spoligotyping (spacer oligonucleotide typing), este método detecta la presencia o ausencia de secuencias de unión variables dentro de la región DR (direct repeat region) y permite detectar patrones de hibridación dependiendo de la cepa de un amplificado in vitro del DNA. Sirve también para diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis*.

Algunas aplicaciones sobre las que se ha aplicado la huella genética con IS6110 han sido: a) examen epidemiológico de la tuberculosis comunitaria, b) detección de la transmisión no sospechada de *M. tuberculosis*, c) confirmación de la transmisión sospechada epidemiológicamente, d) investigación de la transmisión nosocomial, e) estudios sobre patógenesis de tuberculosis (diferenciación entre reinfección y reactivación), f) identificación de contaminación cruzada en el laboratorio.

9.2.- OTROS MARCADORES

9.2.1.- MICOBACTERIOFAGOS

El tipado con fagos que se basa en la sensibilidad de *M. tuberculosis* a diversos bacteriofagos, se ha empleado durante años pero es muy laborioso y puede identificar sólo un limitado número de cepas.

9.2.2.- MYCOBACTERIOCINAS

Takeya y Tokiwa y de Shimamoto y Mizuguchi, describieron sus características y modo de acción junto con su posible utilidad en taxonomía.

Con estas micobacteriocinas se han tipificado epidemiológicamente 11 grupos de *M. tuberculosis*, y también se han utilizado para la tipificación de micobacterias de crecimiento rápido.

9.2.3.- BIOVARIEDADES ENZIMÁTICAS DE MICOBACTERIAS

En 1984 Casal y Linares detectan la diferente actividad enzimática, de *Mycobacterium tuberculosis*, proponiendo su utilidad, como posible marcador epidemiológico.

9.2.4.- PATRONES ANTIMICROBIANOS

El patrón antimicrobiano de resistencia se ha usado para inferir la relación de las cepas. Solo cuando el patrón es inusual puede inferirse la relación de los casos de una manera importante.

10.- CONTROLES MICROBIOLÓGICOS DEL TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO.

La defervescencia del proceso, como un marcador de la mejoría clínica, se detecta dentro de las primeras 2 a 3 semanas. La mejoría clínica y radiológica debe de ocurrir dentro de los 3 meses del tratamiento. Si la fiebre continúa más de tres semanas, acompañada de deterioro clínico o radiológico, hay que contemplar el diagnóstico de tuberculosis multirresistente.

Los pacientes con un microorganismo sensible que realizan un tratamiento correcto presentan

una rápida disminución, respuesta semilogarítmica, en el número de bacilos ácido alcohol resistentes durante las primeras dos semanas. Se produce una reducción de hasta 2 logs por mililitro de esputo durante los dos primeros días de poliquimioterapia efectiva.

En los pacientes con un esputo positivo preterapia, la repetición de la muestra de esputo se puede obtener dentro del primer mes de tratamiento (a las 2-4 semanas) y mensualmente hasta que dos exámenes seguidos sean negativos. El cultivo del esputo debe practicarse hasta que se produzca la conversión negativa bacteriológica. Se recomienda la realización de los controles bacteriológicos mensuales hasta el sexto mes o mientras el paciente tenga expectoración y después trimestralmente en las pautas de 9 y 12 meses.

Se transforma el cultivo en negativo en los que reciben un mes de tratamiento con isoniacida y rifampicina, en la mitad pacientes y al cabo de los 3 meses, en el 90%. Los pacientes cuyos esputos no se han negativizado después de 3 meses de tratamiento deben ser analizados para excluir resistencia a fármacos o inadecuada adhesión al tratamiento.

Los denominados "escapes bacilares" o detección esporádica de cultivos positivos pueden tener su origen en el paciente o resultar de una contaminación de una muestra vecina en el laboratorio. En ocasiones, se detectan baciloscopias positivas durante el final del tratamiento sin que se logre el crecimiento de la micobacteria; son los denominados bacilos inviables.

11.- NIVELES DE LABORATORIOS DE MICOBACTERIOLOGÍA

Clásicamente, los laboratorios de micobacterias han sido clasificados por la OMS, la PAO y las ATS en tres niveles que básicamente son los siguientes:

- Nivel periférico o nivel I. Realiza baciloscopias.
- Nivel intermedio o nivel II. Realiza baciloscopias, cultivo e identificación de *M. tuberculosis*.
- Nivel central o nivel III. Realiza baciloscopias, cultivo identificación de todas las especies, antibiograma, supervisión de otros laboratorios e investigación.

Esta clasificación es una orientación general para países que tienen un programa nacional de lucha contra la tuberculosis.

En nuestro país actualmente los laboratorios, suelen corresponder a los cuatro tipos referidos a continuación:

1. No realización de ningún procedimiento específico (sólo recolección de muestras y transporte a otros laboratorios).
2. Realización de tinción para detección de bacilos ácido alcohol resistentes.

3. Aislamiento de cultivo con identificación de *M. tuberculosis* complex.
4. Identificación definitiva de todas las micobacterias.

12. MEDIDAS DE SEGURIDAD DE LOS LABORATORIOS DE MICOBACTERIOLOGÍA

Legislación sobre protección frente a los riesgos biológicos:

Directiva del Consejo: de 26 de noviembre de 1990 sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo (90/679/CEE, DOCE L 374, de 1, 3-12). En la más reciente directiva 193/88/CEE y en su anexo I, figura la clasificación grupal en la que cada microorganismo queda incluido o Real decreto español 664/1997, de 12 de mayo sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.

Las medidas de seguridad incluirán la puesta en práctica de las recomendaciones de todo laboratorio microbiológico como son las siguientes:

12.1.- RECOMENDACIONES GENERALES

Educación para realizar el trabajo seguro, prohibición de comer, beber, fumar y aplicarse cosméticos o crema de manos, lavado de manos al abandonar el laboratorio, uso de bata (o pijama), dispositivo de protección facial ante el riesgo de salpicaduras o formación de aerosoles y uso de guantes cuando se trabaje con muestras clínicas o medios de cultivo con crecimiento.

12.2.- MEDIDAS PARA REDUCIR LA FORMACIÓN DE ACROSOLES

Manejo adecuado de centrifugas (no frenar para terminar antes, motores con tapa, no llenar en exceso los tubos, preferencia de tubos con rosca, no verter líquidos bruscamente, precauciones al abrir las ampollas y agitar los cultivos, uso de asas de plástico desechable o incineradores de asas biológicas y trabajar en cabinas biológicas de seguridad.

12.3.- MEDIDAS PARA EVITAR EXPOSICIONES ACCIDENTALES

No pipetear con la boca, no encapuchar agujas, protegerse heridas o erosiones o las medidas de barrera ya comentadas.

12.4.- LIMPIEZA O ELIMINACIÓN DE RESIDUOS ADECUADAS

Limpieza de la superficie de trabajo al menos una vez al día y desinfección si existe salpicadura en la superficie. Esterilización o

desinfección antes de la eliminación del material potencialmente infeccioso.

Para los laboratorios o zonas de trabajo de nivel 2 se requiere el denominado nivel 2 de seguridad: llevar guantes para hacer las extensiones, lavarse las manos, evitar la generación de aerosoles, prohibición de manipular fuera de las campanas de seguridad muestras clínicas, manejo adecuado de agujas y eliminación en contenedores resistentes.

Para laboratorios de nivel 3 y 4 se precisaría un nivel de seguridad 3: cabina con filtros HEPA (high-efficiency particulate air) que si el aire recircula dentro del laboratorio deben de revisarse anualmente. Si se utilizan grandes inóculos de micobacterias, como en los laboratorios de nivel 4, se aconseja disponer de una habitación con presión negativa. No estará permitido manipular fuera de las campanas de seguridad medios de cultivo con crecimiento de microorganismos.

Sería aconsejable que el personal al ingreso (y finalizar) en el área de micobacterias se haga un estudio de infección tuberculoso (Prueba de tuberculina en el caso de ser previamente negativo, con o sin radiografía de tórax, y valoración clínico-terapéutica si es positiva).

13. CONTROLES DE CALIDAD

Los controles de la calidad del laboratorio deben hacer referencia no solamente al resultado obtenido y a testificar que un medio de cultivo o sistema son adecuados al objetivo propuesto sino también al tiempo requerido hasta que el solicitante del estudio conoce el resultado.

Todos los medios, reactivos y colorantes deben de estar etiquetadas con su nombre, fecha de recepción, calidad, apertura y uso. Todo el equipamiento del laboratorio (incubadoras, neveras, centrifugas, microscopios, contadoras, neveras, centrifugas, microscopios, congeladores, lámparas de fluorescencia y ultravioletas, filtros,...etc.) debe ser mantenido y controlado exhaustivamente. Debe constar la fecha de revisión de la campana y la fecha de la próxima revisión necesaria.

Se aconseja que exista un manual de procedimientos. Los cambios en el procedimiento deben de ser aprobados por el responsable del laboratorio.

El personal asignado al laboratorio debe ser permanente y si la rotación es necesaria debe permanecer en el laboratorio al menos de 3 a 6 meses.

El laboratorio debe de participar en programas de control de calidad al que se envíen muestras para que entren en la rutina habitual del laboratorio. Cada laboratorio debe analizar sus rutinas y resultados respecto a muestras y

métodos de transportes, procedimientos microscópicos, procedimiento de muestras y cultivos y establecer sus criterios de evaluación.

BIBLIOGRAFÍA.

1. "Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World", The WHO/ULATLD Global Project on Antituberculosis Drug Resistance Surveillance. WHO/TB/97.229.
2. Beer J., Kuchler R., Rodloff AC. Investigations About the Possibility for Testing the Susceptibility of Mycobacteria with the MB/BacT Culture System. J Lab Med 1997, 21:390-398.
3. Bergmann JS., Woods GL, Reliability of Mycobacteria Growth Indicator Tube for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Ethambutol and Streptomycin. J Clin Microbiol 1997, 35:3325-3327.
4. Biehle JR., Cavalieri SJ., Saudoble MA., Getsinger LJ, Evaluation of Etest for Susceptibility of Rapidly Growing Mycobacteria J Clin Microbiol 1995. 33:1760-1764.
5. Bloor B (ed). Tuberculosis. American Society for Microbiology. Washington, DC. 1994.
6. Caminero JA, Casal M. Ausina V, Pina JM, Sauret I. Diagnóstico de la tuberculosis. Arch. Bronconeumol, (1996).32:85-99.
7. Canetti G., Rist N., Grosset J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drugues antibacillaires par la méthode des proportions. Rev Tuberc 1963, 27: 217-272.
8. Casal M., Gutiérrez J.-Estudio del retraso en la detección y tratamiento de casos de tuberculosis. Rev. Clin. Esp. (1986) 178: 109-111.
9. Casal M., J. Gutiérrez y M. Vaquero. Evaluación clínica de un nuevo sistema automático no radiométrico para el diagnóstico rápido de tuberculosis. Rev. Clin. Esp. 1998. 198: 651-654.
10. Casal M., J. Gutiérrez, M. Vaquero. Comparative evaluation of the mycobacteria growth indicator tube with the BACTEC 460 TB system and Lowenstein-Jensen medium for isolation of mycobacteria from clinical specimens. Int. J. Tuberc. Lung. Dis 1997 1: 81-84.
11. Casal M. -Infecciones por Micobacterias en Díaz Rubio M., Espinos D. -Tratado de Medicina Interna. Tomo 2. Editorial Medicina Paramericana. Madrid. 1994. /1741-1754).

- 12.** Casal. M. Laboratory Approaches to Mycobacterial Susceptibility to Antibiotics. Rev. Esp. Quimioterap. 1995. 8 : 184-189.
- 13.** Casal M, Linares M.J. Preliminary Investigation of *Mycobacterium tuberculosis* Biovars. J. Clin Microbiol. 1984. 20:1015-10416.
- 14.** Casal M. Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias (Tuberculosis, Lepra y Micobacteriosis). Edit. Universidad de Córdoba. 1991.
- 15.** Elcuaz R, Martín N, González T, Rosselló J. "Infecciones por micobacterias; rendimiento de la baciloscopia en diferentes muestras clínicas". Med Clin (Barc) 1991. 97: 211-214.
- 16.** Franzblau SG., Witzig RS., McLaughlin JG., Torres P., Madico G., Hernandez A., Degman MT., Cook MB., Quekzer VK, Ferguson RM., Gilman RH Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Using the Micropalette Alamar Blue Assay. J Clin Microbiol 1998. 36: 362-366.
- 17.** Pfluyffer GE, HM Welscher, Kissling P, Cieslak C, Casal M, Gutiérrez J, Sabine Rüscher-Gerdes. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with Radiometric and Solid Culture for Recovery of Acid-Fast Bacilli. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35: 364-368.
- 18.** Garza E, Guerrero M, Tijerina R, Viader J. Determination of Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* through Mycolic Acid Analysis. J Clin Microbiol 1997. 35: 1287-1289.
- 19.** Griffith ME., Barret ML., Bodly HL., Wood RM. Drug susceptibility test for tuberculosis using drug impregnate disks. Am J Clin Pathol 1967. 47: 812-817.
- 20.** Guerrero A, Cobo J, Fortún J, Navas E, Quereda C, Asensio A, Cañón J, Blázquez J, Gómez-Mampaso E. Nosocomial transmission of *Mycobacterium tuberculosis* to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. Lancet 1997, 350. 1738-1742.
- 21.** Hall, GS. Primary processing of specimens and isolation and cultivation of mycobacteria. In Clinics in Laboratory Medicine. Clinical Mycobacteriology Ed. L.B. Heifets. W.B. Saunders Company. 1996. 16:551-567.
- 22.** Heifets, L.B. Mycobacteriology laboratory. In Clinics in a. hest Medicine. Tuberculosisi. Ed. Iseman M.D. and G.A. Huitt. W.B. Saunders Company. 1997. 18: 35-53.
- 23.** Heifets L. Drug susceptibility test in the management of chemotherapy of tuberculosis. En: Drug susceptibility in the chemotherapy of Mycobacterial Infections. CRC Press Inc. 1991. Boca Raton, Florida pag: 90-121.
- 24.** Iseberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology. Washington DC. 1995.
- 25.** Jacobs WR., Barletta RG., Udani R., Chan J., Kalkut G., Kieser T., Sarkis GJ., Hatfull GF., Bloom BR. Rapid assessment od frug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. Science 1993, 260: 819-822.
- 26.** Kawa, D.E., D.R. Pennell, L.N. Dubista, and R.F. Schell, Development of a rapid methods for determining the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid using the Gen- Probe DNA hybridization system. Antimicrob. Agents Chemother. 1989. 33: 100-1005.
- 27.** Kent P.T. Kubica G.P. Public Health Mycobacteriology. A. Guide for the level III Laboratory. 1985. U.S. Department of Health and Human Services . Centers for Disease Control. Atlanta. Georgia 30333.
- 28.** Kirk SM., Schell RF., Moore AV., Callister SM., Mazurek GH., Flow cytometric Testing od Susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis Isolates to Ethambutol, Isoniazid and Rifampin in 24 hours. 1998. J Clin Microbios 36: 1568-1573.
- 29.** Kubica B.P., D y E. W. -Laboratory Methods for Clinicals and Publics Health Mycobacteriology. CDC. Atlanta. 1967.
- 31.** Labombardi VJ, Carter L, Massarella S. Use of Nucleic Acid Probes to identify mycobacteria directluy from Difco ESP-MycoBottles. J Clin Microbiol 1997. 35: 1002-1004.
- 32.** Martín-Casabona N, D. Xairó Mimó, T. González, J. Rosselló, L. Arcalis. "Rapid Method for test Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* by Using DNA Probes ". 1997 J Clin Microbiol 35:2521-2525.
- 33.** Master, R.N. Mycobacteriology. In Clinical Microbiology Procedures Handbook. Ed H.D. Iseberg. American Society for Microbiology. Washington D.C. 1992.
- 34.** Meissner G. The absolute concentration method for testing teh susceptibility of

mycobacterium tuberculosis to antimicrobial drug. WHO TB. Theen. Information 1961.13-19.

- 35.** Michison DA. Laboratory techniques for the determination of sensitivity of tubercle bacillus to isoniazid streptomycin and PAS Lancet 1953, 1:213.
- 36.** Miyamoto J., Koga H., Kohno S., Tashiro T Hara K. New drug susceptibility test for *Mycobacterium tuberculosis* using the hybridization protection assay. J Clin Microbiol. 1996 34: 1323-1326.
- 37.** Morris S., Baig H., Suffys P., Portillo-Gómez L., Fairchok M., Rouse D. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis, 1995, 171: 954-960.
- 38.** Mshana RN., Tadesse G., Abate G., Mimer H. Use of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2-5Diphenyl Tetrazolium Bromide for Rapid Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin Microbiol 1998, 36: 1214-1219.
- 39.** Murray P, Baron EJ., Pfaller MA, a-enover FC., Tenover FC., Tenover FC. (eds). Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. American Society for Microbiology-Washington, DC. 1995.
- 40.** Nachamkin I., Kang C., Weinstein MP Detection of resistance to isoniazid, rifampin and streptomycin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by molecular methods. Clin Infect Dis 1997, 24: 849-900.
- 41.** Nilsson LE, Hoffner SE., Ansehn S. Rapid Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* ATP. Antimicrob Agents Chemother 1988, 32: 1208-1212.
- 42.** Pablos-Mendez A. Raviglione MC., Laszlo A., and cols, and members of the World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Global Surveillance for Antituberculosis-Drug Resistance, 1994-1997. N Engl J Med 1998.338: 1641-1649.
- 43.** Possau R., Traore H., De Beenttower H., Mijs W., Jannes G., De Rijk P., Portaels F. Evaluation for the Inno-Lipa Rif TB Assay, a Reserver Hybridization Assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its Resistance to Rifampin. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41: 2093-2098.
- 44.** Siddiqi SH. Libonati JP., Middlebrook G. Evaluation of a rapid radiometric method for drug

susceptibility test of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin Microbiol 1981, 13:908-912.

- 45.** Siddiqi SH., Hawkins JE., Laszlo A. Interlaboratory drug susceptibility testing *Mycobacterium tuberculosis* by radiometric procedure and two conventional methods. J clin Microbiol 1985, 22: 2332-2338.
- 46.** Snider, DE, Jr, Jones WD, Good RC. The usefulness of phage typing *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Am. Rev. Resp Dis 1984; 130: 1095-1099.
- 47.** Steadgan HE, M Stakk SK., Simmaank LJ. Use of BACTEC system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium Tuberculosis*, *M. Kansasii* and *M. avium* complex. Diag Microbiol Infect Dis. 1985, 3:33-36.
- 48.** Telenti A., Imboden F., Schmidheini T., Bodmer T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium Tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism. Antimicrob Agents Chemother 1993, 37: 2054-2058.
- 49.** Telles M A S and Yates M D. Single and double drug susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex and mycobacteria other than the tubercle (MOTT) bacilli by a microdilution broth minimum inhibitory concentration (MIC) method. Tubercle and Lung Disease 1994; 75: 286-290.
- 50.** Vidal R., Martín Casabona N., Juan A., Falgueras T., Miravittles M. Incidence and Significance of Acid-Fast Bacilli in Sputum Smears at the end of Antituberculous Treatment. Ches 1996, 109: 1562-1565.
- 51.** Tortoli E, Cichero P, Chirillo G, Gismondo MR, Bono L, Gesu G, Simoneti MT, Volpe G Nardi G, Marone P. Multicenter comparison of ESP culture System II with BACTEC 460 TB and with Lowenstein-Jensen Medium for recovery of *Mycobacteria* from different clinical specimens, including Blood. J Clin Microbiol 1998, 36, 1378-1381.
- 52.** Walters SB., Hanna BA. Testing of Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Isoniazid and Rifampin by *Mycobacterium* Growth Indicator Tube Method. J Clin Microbiol. 1996, 34: 1565-1567.
- 53.** Woods GL, Fish G, Plaunt M, Murphy T. Clinical evaluation of Difco ESP culture system II for Growth and detection of *Mycobacteria*. J Clin Microbiol. 1997, 35, 121-124.

54. Zhang Y., Young D. Molecular genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* J. Antimicrob Chemother 1994, 34: 313-319.