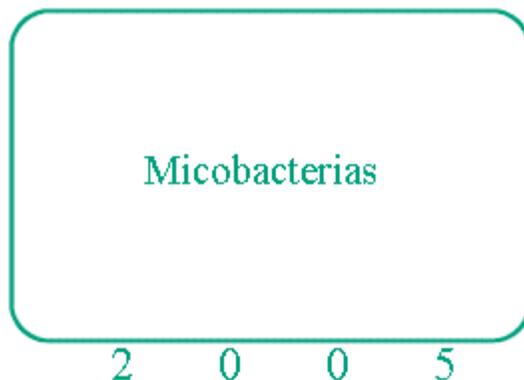


Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

9a.



Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

Coordinador: Fernando Alcaide Fernández de Vega

Autores: Fernando Alcaide Fernández de Vega

Jaime Esteban Moreno

Julián González Martín

Juan José Palacios Gutiérrez



ISBN: 84-609-7032-9

INDICE:

INDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción.
2. Consideraciones microbiológicas.
3. Clasificación y consideraciones clínicas.
 - 3.1. Complejo *Mycobacterium tuberculosis*
 - 3.2. *Mycobacterium leprae*.
 - 3.3. Micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento
 - 3.4. Micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido
 - 3.5. Otras micobacterias no tuberculosas
4. Muestras: selección, recogida, transporte y conservación.
 - 4.1. Elección de la(s) muestra(s)
 - 4.2. Muestras respiratorias
 - 4.3. Sangre
 - 4.4. Líquidos estériles (cefalorraquídeo, articular, peritoneal, pleural, pericárdico, etc.).
 - 4.5. Tejidos (biopsias)
 - 4.6. Orina
 - 4.7. Heces.
5. Microscopía.
 - 5.1. Tinciones
 - 5.2. Sensibilidad y especificidad
 - 5.3. Observación microscópica
 - 5.4. Interpretación y expresión de los resultados.
 - 5.5. Falsos resultados
6. Pretratamiento de las muestras: digestión y descontaminación.
7. Cultivo.
 - 7.1. Medios sólidos.
 - 7.2. Medios bifásicos
 - 7.3. Medios líquidos.
 - 7.4. Condiciones de incubación
8. Identificación.
 - 8.1. Identificación fenotípica.
 - 8.2. Identificación cromatográfica.
 - 8.3. Identificación molecular.
9. Detección directa de *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra clínica.
 - 9.1. Sistemas de amplificación comerciales
 - 9.2. Sistemas de amplificación caseros.
 - 9.3. Micobacteriófagos.
10. Pruebas de determinación de la sensibilidad.
 - 10.1. Pruebas de sensibilidad en *Mycobacterium tuberculosis*.
 - 10.2. Pruebas de sensibilidad en micobacterias no tuberculosas de crecimiento lento.
 - 10.3. Pruebas de sensibilidad en micobacterias no tuberculosas de crecimiento rápido.
11. Epidemiología molecular.
 - 11.1. Epidemiología molecular de *M. tuberculosis*
 - 11.2. Epidemiología molecular
12. Estructura, dotación y seguridad del laboratorio de micobacterias.
 - 12.1. Niveles de los laboratorios de micobacteriología
 - 12.2. Bioseguridad en el laboratorio de micobacterias
13. Bibliografía.

INDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. Tinción de Ziehl-Neelsen.
2. Digestión y descontaminación de las muestras clínicas con N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sodio para el cultivo de micobacterias.
3. Cultivo de micobacterias en medio sólido de Löwenstein-Jensen.
4. Cultivo de micobacterias en medios líquidos mediante sistemas automatizados.
5. Identificación fenotípica de las micobacterias
6. Identificación de micobacterias mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC).
7. Identificación molecular de micobacterias mediante PCR-RFLP del gen *hsp65* (PRA).
8. Detección directa de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas mediante amplificación genómica (PCR de la IS6110).
9. Pruebas de sensibilidad en *Mycobacterium tuberculosis* mediante el método de las proporciones en agar.
10. Pruebas de sensibilidad en *Mycobacterium kansasii* a los fármacos de primera línea mediante el sistema Bactec 460.
11. Pruebas de sensibilidad en micobacterias de crecimiento rápido mediante microdilución en caldo.
12. Epidemiología molecular de *Mycobacterium tuberculosis* mediante *spoligotyping*.
13. Epidemiología molecular de *Mycobacterium tuberculosis* mediante RFLP de la IS6110 (ver documento técnico PNT-MMT-02 en el Procedimiento nº 18 de los Procedimientos en Microbiología Clínica, SEIMC. 2ª Edición).

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades

Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

9a. MICOBACTERIAS. 2005

Coordinador: Fernando Alcaide Fernández de Vega

Autores: Fernando Alcaide Fernández de Vega

Jaime Esteban Moreno

Julián González Martín

Juan José Palacios Gutiérrez

1. INTRODUCCIÓN

Las micobacterias son un grupo de microorganismos de gran importancia clínica, ya que existen múltiples especies que son agentes causales de diversas infecciones humanas con una importante morbilidad y mortalidad. Algunas enfermedades, como la tuberculosis y la lepra, han ido ligadas a la historia del hombre. A pesar de los esfuerzos realizados para su control, en la actualidad constituyen uno de los problemas sanitarios de mayor gravedad a nivel mundial. Según datos de la OMS, cerca de dos millones de personas murieron de tuberculosis en 2002. Se calcula que alrededor de un tercio de la población mundial está infectada por el bacilo tuberculoso y que cada segundo se infecta una persona más. De esta forma las previsiones son desoladoras, ya que se estima que entre 2002 y 2020, cerca de 150 millones de personas enfermarán y 36 millones fallecerán por esta enfermedad. No obstante, hay que considerar que existe una gran variabilidad geográfica; el mayor número de casos ocurren en el Sudeste Asiático y África, seguidos por América Latina y el Este de Europa. Este hecho está directamente relacionado con las condiciones socioeconómicas y el impacto de la epidemia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en dichas zonas. A ello se une la aparición, en los últimos años, de cepas resistentes y multirresistentes a los agentes antimicrobianos.

La lepra también representa un problema de primer orden. La OMS (2001) ha constatado que, aunque existe una disminución en la prevalencia de la enfermedad, se ha observado un incremento en la incidencia de la misma (>700.000 casos). La mayoría de los pacientes se encuentran en Asia, África y Sudamérica, especialmente en seis países (83%), siendo la India donde se concentran la mayoría de los casos.

Por otro lado, las micobacteriosis o enfermedades producidas por otras micobacterias diferentes de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, han ido tomando un mayor protagonismo. Se ha observado fundamentalmente en los países con un mayor desarrollo económico y también con la aparición de la infección por el VIH. Así, en la última década en España, en muchos laboratorios de microbiología estas especies han supuesto entre el 15 y el 30% de los aislamientos micobacterianos. Todo ello junto al creciente desarrollo de nuevas técnicas de cultivo, diagnóstico y pruebas de sensibilidad, está condicionando la metodología a emplear por los laboratorios de micobacteriología.

2. CONSIDERACIONES MICROBIOLÓGICAS

El género *Mycobacterium* es el único que pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al orden *Actinomycetales*. Las especies de este género presentan un elevado contenido de G+C (61-71%) en su ADN. Esto es

compartido por otros géneros relacionados que también poseen ácidos micólicos en la pared celular, como son *Gordona*, *Tsukamurella*, *Nocardia* y *Rhodococcus*.

Las micobacterias son microorganismos aerobios estrictos, inmóviles, de morfología variable (bacilar o cocoide), que no forman esporas y no poseen flagelos ni cápsula. En cambio, poseen una pared celular gruesa y con un elevado contenido lipídico que supone el 60% del peso seco de la misma. Esta pared consta de cuatro capas: la más interna es el peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico con cadenas cortas de alanina o glicina en el caso de *M. leprae*. Esta capa da rigidez y forma a la bacteria. La segunda posee arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos micólicos de la tercera capa. Se trata de ácidos grasos de cadena larga (60-90 átomos de carbono) de gran importancia taxonómica. La capa más externa se encuentra constituida por lípidos como el *cord factor* (trehalosa 6,6'-dimicolato) y por mucósidos. En conjunto, esta composición de la pared le confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad celular, que es responsable, entre otras cosas, de la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos, así como de la característica ácido-alcohol resistencia con determinadas tinciones para su visualización microscópica. Además, determinados componentes de la pared, como el lipoarabinomano, intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos.

La gran mayoría de las micobacterias de interés clínico tienen un crecimiento muy lento con un tiempo de multiplicación de 15 a 18 horas en condiciones favorables. De ahí que sean necesarias de 1 a 3 o más semanas de incubación para obtener un crecimiento apreciable en los medios de cultivo convencionales. No obstante existe un grupo de especies que tienen un crecimiento algo más rápido que les permite, entre otras cosas, diferenciarlas del resto.

En general las necesidades nutritivas de las micobacterias son sencillas, requiriendo una fuente de carbono (glicerol) y nitrógeno (amonio o aminoácidos) así como determinadas sales minerales. Tan sólo algunas especies (*Mycobacterium genavense* o *Mycobacterium haemophilum*) precisan unos suplementos especiales como son micobactina, hemina u otros componentes férricos. Por otro lado, el crecimiento de las micobacterias se ve estimulado por la presencia de CO₂ y ácidos grasos. Un caso aparte es *M. leprae* que sólo es capaz de crecer en cultivos celulares.

Aunque la temperatura óptima de crecimiento general suele ser de 35-37°C, existen determinadas especies que precisan temperaturas de 30°C (*Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans*, *M. haemophilum*), 42°C (*Mycobacterium xenopi*) o 52°C (*Mycobacterium thermoresistibile*) para obtener una mejor tasa de crecimiento.

Un aspecto relevante de estos microorganismos es su mayor resistencia, respecto a otras bacterias no formadoras de esporas, a los ácidos, álcalis y determinados desinfectantes químicos. Además son muy resistentes a la desecación o congelación, lo que les permite sobrevivir durante semanas o meses en el medio ambiente, tanto en superficies de objetos inanimados como en el suelo o el estiércol. Sin embargo, deben permanecer al abrigo de la luz del sol ya que los rayos ultravioletas son letales para los mismos. También, el calor (pasteurización) y determinados productos como el óxido de etileno, formaldehído, etanol (70%), glutaraldehído (2%), ácido peracético o peróxido de hidrógeno estabilizado, entre otros, son eficaces contra estas bacterias. Por otro lado, hay que tener en cuenta la posible presencia de materias orgánicas que contengan proteínas (ej., esputo), ya que pueden ofrecer a la micobacteria cierta protección frente a múltiples agentes desinfectantes haciéndolos inoperantes.

3. CLASIFICACIÓN Y CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Dentro del género *Mycobacterium* se han descrito más de 100 especies que pueden clasificarse de múltiples maneras. Hace años, según la velocidad de crecimiento, la morfología y capacidad de pigmentación de las colonias en medios sólidos, las micobacterias se dividieron en diversos grupos. Así, se establecieron dos grupos clásicos: micobacterias de crecimiento lento y rápido según requieran más o menos de 7 días, respectivamente, para producir colonias visibles en un subcultivo sólido con un inóculo diluido. Y por otro lado, se combinaba la posibilidad de no producir pigmento (no cromógenas) o hacerlo en ausencia (escotocromógenas) o presencia de la luz (fotocromógenas). De esta forma surgieron 4 grupos con cierta trascendencia clínica (Runyon, 1959): Grupo I (fotocromógenas), Grupo II (escotocromógenas) y Grupo III (no cromógenas) que eran de crecimiento lento y el Grupo IV que eran las de crecimiento rápido. Una modificación de esta clasificación se muestra en la tabla 1. Aunque esta clasificación tiene cierta utilidad microbiológica, en la actualidad, ante la incesante aparición de nuevas especies y las diferentes características fenotípicas que algunas de ellas pueden adoptar, se prefiere realizar una individualización al nivel de especie.

Con fines prácticos se establecen tres grupos en función de la entidad(es) nosológica(s) producida(s): a) el complejo *M. tuberculosis* que produce la tuberculosis se encuentra formado por las especies *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* (incluido el bacilo de Calmette-Guerin o BCG utilizado en la vacunación), *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microti*, que produce tuberculosis en las ratas; b) la lepra que está causada por *M. leprae*; y c) las micobacteriosis, que están producidas por el resto de micobacterias distintas

de las anteriores. Este es un grupo complejo que ha recibido múltiples denominaciones: micobacterias atípicas, ambientales, oportunistas o no tuberculosas, entre otras. Aunque ninguna de ellas es totalmente adecuada, en el presente documento se ha adoptado la de micobacterias no tuberculosas (MNT). Estas se caracterizan por un menor poder patógeno que varía de especie a especie, pudiendo ser oportunistas o simplemente saprofitas. Por otro lado el reservorio parece ser, en muchos casos, ambiental sin haberse documentado la transmisión interhumana. Por último, las MNT presentan una mayor resistencia a los antimicobacterianos convencionales.

3.1. COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis*

Aunque la identificación del complejo *M. tuberculosis* con pruebas bioquímicas (niacina, nitratos y catalasa positivas) o sondas de ADN es relativamente sencilla, la caracterización de especie suele requerir una mayor complejidad técnica. Por ello, en la actualidad, la mayoría de los laboratorios de microbiología realizan una identificación del complejo y tan sólo, en determinados casos ante la sospecha clínica y/o microbiológica de *M. bovis*, se realiza una identificación más detallada para conocer la especie aislada. Algunas diferencias básicas entre ambas especies son claras. Epidemiológicamente el reservorio fundamental de *M. tuberculosis* es el hombre (infectado o enfermo), mientras que en *M. bovis* suele ser el ganado bovino. Por otro lado esta última presenta resistencia natural a la pirazinamida, que además de las implicaciones de tratamiento que conlleva, permite orientar la identificación de la especie.

El mecanismo de transmisión más importante es la vía aérea. El enfermo tuberculoso, especialmente el bacilífero, al hablar, estornudar y, sobre todo, toser, elimina múltiples gotas aerosolizadas y cargadas de bacilos. Sin embargo, tan sólo las gotitas de 1-5 µm son las que tienen capacidad infecciosa real, al poder alcanzar la región alveolar. Otros mecanismos de transmisión reconocidos son: a) vía digestiva (segunda en frecuencia), como el caso de *M. bovis* a partir del ganado bovino; b) vía urogenital; c) vía cutáneo-mucosa; d) inoculación; y e) vía transplacentaria.

Una vez que se ha producido el contagio, la inmunidad celular se encarga de limitar la infección. Tan sólo el 5% de los casos quedará sin control inicial, evolucionando a una tuberculosis primaria. En el resto (95%), los bacilos permanecerán controlados en estado latente, de los cuales, un pequeño porcentaje (5%) presentará la enfermedad años después como un proceso de reactivación. En general, la probabilidad de enfermar dependerá, en gran medida, de diversos factores o condiciones del huésped que conllevan una cierta inmunodeficiencia. En los pacientes muy inmunodeprimidos con SIDA u otros procesos, la reactivación puede suponer cerca de la mitad de los casos.

Tabla 1. Clasificación modificada de Runyon de las micobacterias más frecuentemente aisladas en muestras clínicas.

Micobacterias de crecimiento lento			MNT de crecimiento rápido
Grupo I. Fotocromógenas	Grupo II. Escotocromógenas	Grupo III. No cromógenas	Grupo IV. No cromógenas
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. abscessus</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. chelonae</i>
<i>M. marinum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. simiae</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. mucogenicum</i>
	<i>M. xenopi</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. peregrinum</i>
		<i>M. haemophilum</i>	<i>M. porcinum</i>
		<i>M. intracellulare</i>	
		<i>M. malmoense</i>	
		<i>M. nonchromogenicum</i>	
		<i>M. shimoidei</i>	
		<i>M. terrae</i>	
		<i>M. triviale</i>	
		<i>M. tuberculosis</i>	
		<i>M. ulcerans</i>	

La detección de la población infectada se puede realizar mediante la prueba de la tuberculina (PT). Esta sustancia es un derivado proteico purificado (PPD) obtenido de un filtrado de un cultivo de *M. tuberculosis* esterilizado y concentrado. La prueba estándar recomendada por la OMS es la intradermorreacción de Mantoux, que consiste en la inyección intradérmica de 2 UT (unidades internacionales) de PPD-RT23. Esta prueba se basa en la hipersensibilidad que pueden tener las personas que han estado en contacto previo con el bacilo tuberculoso, que han sido vacunadas con el BCG o que han tenido una infección con MNT. Debido a las limitaciones de especificidad y sensibilidad inherentes a la prueba de la tuberculina, recientemente, se han desarrollado diversos inmunoensayos basados en la detección de la secreción de Interferón (IFN)-gamma por linfocitos T del paciente tras incubarlos con determinados antígenos tuberculosos. Aunque estos métodos parecen tener una mayor especificidad, todavía está pendiente el conocer cuál es el papel exacto que pueden tener en el diagnóstico de la infección tuberculosa.

La tuberculosis es una enfermedad crónica y granulomatosa que suele afectar a nivel pulmonar, aunque puede tener otras muchas localizaciones e incluso ser una enfermedad diseminada (miliar). Estas formas extrapulmonares suelen ser más frecuentes en pacientes con una inmunodepresión importante (ej. SIDA). El diagnóstico de la enfermedad se lleva a cabo en función de las características clínicas, la radiología, anatomía patológica, microbiología y otras pruebas complementarias. Sin embargo la microbiología es fundamental ya que, además de la posible detección microscópica de los bacilos en la muestra, el aislamiento del agente causal en el cultivo y su posterior identificación sigue siendo la clave del

diagnóstico definitivo de tuberculosis. Además, se podrán realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos y posibles estudios moleculares para su vigilancia epidemiológica.

3.2. *Mycobacterium leprae*.

Esta micobacteria es el agente causal de la lepra (enfermedad de Hansen) que, según estimaciones de la OMS, la padecen cerca de 8 millones de personas en el mundo, fundamentalmente en países en vías de desarrollo. India, China, Myanmar, Indonesia, Brasil y Nigeria concentran más del 80% de todos los casos. Se trata de una enfermedad crónica, granulomatosa y debilitante, que afecta sobre todo a los tejidos corporales más fríos, especialmente la piel y el sistema nervioso periférico. La lepra presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas en consonancia con las lesiones anatomopatológicas y los mecanismos inmunitarios implicados. Así, en un extremo está la lepra tuberculoide (LT) con lesiones localizadas y un número escaso de bacilos demostrables, y en el otro polo estaría la forma avanzada y progresiva de lepra lepromatosa (LL) con manifestaciones más generalizadas, abundantes bacilos y ausencia de inmunidad celular que controle la infección. Entre ambas formas existen múltiples estadios intermedios.

La transmisión de la infección continúa siendo desconocida, aunque el 50% de los casos tienen una historia de contacto íntimo y prolongado con una persona enferma que probablemente se haya contagiado a través de aerosoles (gotitas nasales) o de las lesiones cutáneas. Otras vías de transmisión podrían ser el contacto con el suelo infectado y la intervención de insectos vectores.

M. leprae es un bacilo intracelular obligado, indistinguible microscópicamente de otras micobacterias, que posee en la cápsula externa gran

cantidad de un glucolípido fenólico (PGL-1) específico, con cierto valor en las pruebas serológicas. En general el diagnóstico de la lepra se basa en los hallazgos clínicos y la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes en el material tomado de las lesiones cutáneas o del lóbulo de la oreja, ya que esta micobacteria, a diferencia del resto, no se puede cultivar *in vitro* en los medios habituales. La detección de anticuerpos IgM frente a PGL-1 tiene cierta utilidad en los pacientes con LL no tratada ya que están presentes en el 95% de los casos. Sin embargo, sólo en el 60% de los pacientes con lepra tuberculoides son valorables, que es la forma con mayores problemas diagnósticos clínicos e histológicos, ya que presenta un número bajísimo de bacilos en los tejidos. Además, hay que recordar que en zonas endémicas estos anticuerpos se pueden detectar en personas clínicamente sanas. Por otro lado, la prueba intradérmica de la lepromina (extracto de bacilos muertos) tampoco es de utilidad diagnóstica. Más recientemente, la introducción de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la detección e identificación de *M. leprae*, ha demostrado su rentabilidad en muestras dérmicas en las formas lepromatosas, mientras que su sensibilidad es tan sólo de un 50% en las formas tuberculoides.

3.3. MNT DE CRECIMIENTO LENTO

3.3.1. Complejo *Mycobacterium avium*. Este complejo también denominado *M. avium-intracellulare* (CMA) se define como cocobacilos ácido-alcohol resistentes no tuberculosos de crecimiento lento a 37°C (10-21 días en medios de rutina), que producen unas colonias pequeñas, lisas translúcidas u opacas no cromógenas, y que son patógenos oportunistas capaces de producir enfermedad en animales (aves y cerdos) y en el hombre. No obstante, existen variantes morfológicas con rugosidad colonial y cepas que producen un pigmento amarillento.

Este complejo está constituido por *M. avium*, *M. intracellulare* y un tercer grupo dentro del cual se ha caracterizado recientemente la especie *Mycobacterium chimaera*, (*Mycobacterium* especie X) miembro aún no bien caracterizado. Dentro de *M. avium* se reconocen cuatro subespecies: subsp. *avium*, subsp. *paratuberculosis*, subsp. *silvaticum* y subsp. *hominissuis*. Ante la imposibilidad de distinguir las especies con las pruebas bioquímicas habituales se recurrió a la agrupación y denominación de complejo *M. avium-M. intracellulare*. La heterogeneidad del grupo queda patente ya en los primeros trabajos de serotipado. Mediante hibridación con sondas de ADN se conoce que, de los 28 serotipos descritos, los serotipos 1-6, 8-11 y 21 corresponden a *M. avium* y los tipos 7, 12-20 y 22-28 son de *M. intracellulare*. Actualmente estas especies pueden identificarse y diferenciarse fácilmente mediante técnicas cromatográficas y, sobre todo, genéticas. Gracias a

ello, cada vez se conoce más sobre las diferencias particulares entre estas especies respecto a la epidemiología, patogenia y clínica. Así por ejemplo, mediante sondas de ADN se ha observado que hasta el 98% de los aislamientos de CMA procedentes de pacientes con SIDA eran *M. avium*, mientras que el 40% de los aislados de este complejo en pacientes sin SIDA eran *M. intracellulare*. En consecuencia, la denominación, identificación y valoración microbiológica del complejo, como en las demás micobacterias, debería realizarse siempre al nivel de especie.

A diferencia de *M. tuberculosis*, cuyo reservorio y fuente de contagio es el hombre, estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. De hecho, CMA ha sido aislado en el agua, suelo, plantas y animales.

Hasta 1981, y debido a la baja patogenicidad de estas bacterias, las enfermedades producidas por CMA fueron escasas y localizadas, especialmente en los pulmones. Posteriormente, con la pandemia del SIDA, estos microorganismos se convirtieron en las infecciones por MNT más frecuentes, pudiendo afectar de forma diseminada o focal (pulmones, tracto gastrointestinal o ganglios linfáticos). En la actualidad, con la introducción en 1996 de la terapia antirretroviral de alta eficacia en los pacientes infectados por el VIH, se ha constatado una disminución espectacular de las infecciones por CMA. El diagnóstico de enfermedad en las formas localizadas, como en el resto de MNT, suele ser algo más complicado que en la tuberculosis. El aislamiento de estas bacterias en muestras respiratorias o digestivas por ejemplo, puede indicar tan sólo una colonización. Por tanto, para establecer el diagnóstico de enfermedad deberían aplicarse los criterios de la ATS (*American Thoracic Society*).

3.3.2. *Mycobacterium genavense*. En 1991 se aisló este microorganismo en la sangre de un paciente con SIDA en Ginebra (Suiza). La especie se describió en 1993 y fue, hasta la llegada de la terapia antirretroviral de alta eficacia, la segunda MNT más aislada tras CMA en pacientes con SIDA. Al igual que ésta, suele producir infecciones generalizadas en pacientes inmunodeprimidos, aunque también se han descrito infecciones entéricas, genitales y de tejidos blandos. Microbiológicamente es una especie cocobacilar y no cromógena muy similar al complejo *M. avium*. Sin embargo *M. genavense* crece mal en medios sólidos convencionales. A pesar de haberse logrado crecimientos tras largos periodos de incubación (1-3 meses) con agar 7H11 de Middlebrook suplementado con micobactina J, carbón activado o sangre, la mayoría de los aislamientos suelen recuperarse únicamente en medios líquidos, sobre todo cuando estos son acidificados (pH= 6,2).

3.3.3. *Mycobacterium haemophilum*. El primer aislamiento de *M. haemophilum* se realizó en 1978 a partir de una lesión subcutánea en un paciente con

enfermedad de Hodgkin. La mayoría de las infecciones descritas afectan a la piel y al tejido subyacente de pacientes inmunocomprometidos con SIDA o con trasplante de médula ósea. También se han descrito linfadenopatías cervicales o nódulos pulmonares en niños, así como osteomielitis. Esta especie no cromógena requiere medios de cultivo con un suplemento de citrato amónico férrico o hemina para su recuperación. Una posibilidad sería añadir una tira o disco con factor X en el medio sólido cuando se sospeche la presencia de dicha bacteria o simplemente inocular una placa de agar chocolate. El desarrollo óptimo se logra con una incubación entre 28° y 32°C y un 10% de CO₂. Además la identificación bioquímica es ardua ya que, salvo la prueba de la pirazinamidas, suelen ser bioquímicamente inertes. Posiblemente, todas estas dificultades han llevado al desconocimiento de la auténtica frecuencia de las infecciones por esta micobacteria.

3.3.4. *Mycobacterium kansasii*. Este “bacilo amarillo”, como se le conoció en un principio a partir de su descripción en 1953, es un importante patógeno siendo en la actualidad, en muchas partes del mundo, la MNT más frecuentemente aislada. No obstante, la incidencia de la infección por este microorganismo parece tener una notable variabilidad geográfica. La mayoría de los aislamientos son clínicamente significativos, causando, principalmente, una enfermedad pulmonar crónica, progresiva y cavitaria muy similar a la tuberculosis. Generalmente suele existir una enfermedad subyacente de base, que en muchos casos afecta al aparato respiratorio (EPOC, bronquiectasias, etc.). También puede producir linfadenitis cervical, infecciones osteoarticulares, cutáneas y de los tejidos blandos, así como infecciones diseminadas en pacientes inmunocomprometidos, especialmente los infectados por el VIH.

Este microorganismo se ha aislado en animales, suelo y sobre todo en el agua dulce, tanto en los sistemas de suministro para el consumo humano, como en ríos y lagos.

M. kansasii es una micobacteria de crecimiento lento, generalmente fotocromógena y con una temperatura óptima de incubación de 37°C. Al microscopio se muestra como bacilos largos, gruesos y teñidos irregularmente. Además se caracteriza por hidrolizar de forma rápida el Tween 80 (3 días), reducir los nitratos a nitritos y presentar actividad catalasa a 68°C. Aunque aparentemente y de forma fenotípica parece una especie bastante homogénea, en los últimos años se ha observado, mediante estudios moleculares, una importante heterogeneidad dentro de la misma. Así, en la actualidad, se conocen siete subtipos identificados mediante PCR-RFLP del gen *hsp65*, con una incidencia y patogenicidad diferente. Además, mediante estudios filogenéticos, se ha observado una gran relación con *M. gastri*.

3.3.5. *Mycobacterium malmøense*. Esta especie fue descrita en 1997 tras el aislamiento en muestras respiratorias de cuatro pacientes de la ciudad de Malmö (Suecia). Desde entonces se han notificado múltiples casos, sobre todo en Europa, de enfermedades pulmonares crónicas en adultos y linfadenitis cervicales en niños. El crecimiento excesivamente lento puede dificultar su recuperación y la valoración de la incidencia real de esta micobacteriosis. Al igual que CMA, son cocobacilos ácido-alcohol resistentes, que no producen pigmento y se muestran inertes a casi todas las pruebas bioquímicas. La mayoría de los aislamientos suelen ser resistentes a un gran número de antimicobacterianos, salvo al etambutol y a la cicloserina.

3.3.6. *Mycobacterium marinum*. Es el agente causal del “granuloma de las piscinas”, ya que produce unas lesiones cutáneas granulomatosas que suelen ocurrir cuando la piel erosionada entra en contacto con agua salada o dulce inadecuadamente clorada y que, en muchas ocasiones, se relaciona con la manipulación del pescado. Tras 2-3 semanas de incubación aparece una lesión pápulo-nodular en el punto de inoculación de la extremidad afectada (dedos, codos y rodillas). Las lesiones aumentan de tamaño, se ulceran y exudan pus con abundantes bacilos ácido-alcohol resistentes que son relativamente largos. Además, la infección puede extenderse a los ganglios linfáticos y simular una esporotricosis.

M. marinum es una especie fotocromógena cuya temperatura de incubación óptima es de 30°C, lo que le permite crecer con cierta rapidez en los medios convencionales (7-14 días).

3.3.7. *Mycobacterium scrofulaceum*. En la actualidad esta especie escotocromógena parece estar en declive. Hasta hace 20 años, *M. scrofulaceum* era la MNT más implicada en los casos de linfadenitis cervical en niños. Sin embargo, y paralelamente, se han descrito hasta ocho nuevas especies causantes de esta patología, mientras que se ha producido un descenso en los casos notificados por *M. scrofulaceum*.

3.3.7. *Mycobacterium simiae*. Esta especie se aisló inicialmente en 1965 en monos (*Macacus rhesus*) y en el medio ambiente (agua potable). La patología que causa es similar a la del CMA e incluye osteomielitis, enfermedad pulmonar crónica y diseminada, especialmente en pacientes con SIDA. Aunque la morfología de las colonias es parecida a la del CMA, la mayoría de los aislamientos son fotocromógenos lentos, presentan catalasa termoestable y la niacina es positiva. Este último dato es raro en MNT lo que podría ocasionar alguna confusión con *M. tuberculosis*. En ocasiones, la identificación definitiva requiere pruebas cromatográficas (ácidos micólicos) y sobre todo genéticas. Los pocos datos *in vitro* disponibles indican que la mayoría de los aislamientos son resistentes a los fármacos antituberculosos.

3.3.8. *Mycobacterium szulgai*. Esta micobacteria, descrita en 1972, tiene la peculiaridad de ser escotocromógena cuando crece a 37°C y fotocromógena a 25°C. Por otro lado, aunque fenotípicamente se parece a *M. gordonae* o *M. scrofulaceum*, mediante secuenciación del 16S rRNA se asemeja a *M. malmoense*. Normalmente, *M. szulgai* suele ser un aislamiento poco frecuente que puede producir una infección pulmonar similar a la tuberculosis o infecciones extrapulmonares como la bursitis, tenosinovitis, enfermedades cutáneas localizadas y osteomielitis.

3.3.9. *Mycobacterium ulcerans*. Aunque se describió en 1948, hasta hace pocos años no se le ha dado la importancia que realmente tiene. Ello se debe a que esta micobacteria no cromógena es difícil de cultivar, ya que precisa una incubación muy larga (6 a 12 semanas) y a baja temperatura (30°C). Además, algunos pretratamientos pueden ser nocivos para su posterior recuperación.

En la actualidad produce una de las infecciones micobacterianas más frecuentes tras tuberculosis y lepra: la úlcera de Buruli o Bairnsdale dependiendo que sea en África o Australia. Esta enfermedad, que también se ha detectado en América del Sur y Nueva Guinea, consiste en un nódulo localizado que puede evolucionar ulcerándose y produciendo grandes lesiones destructivas, o bien puede producir lesiones más profundas como la osteomielitis. Todo ello puede conducir, con frecuencia, a importantes deformidades en las extremidades. El mecanismo exacto de transmisión se desconoce. No obstante, al ser una micobacteria ambiental relacionada con zonas húmedas y aguas estancadas, la transmisión podría ocurrir por vía directa en la piel erosionada o con la participación de insectos acuáticos.

3.3.10. *Mycobacterium xenopi*. Se trata de una micobacteria escotocromógena que se aisló en 1957 en un sapo de África (*Xenopus laevis*) y que posee capacidad patógena (pulmonar y ganglionar), aunque cerca del 90% de los aislamientos clínicos son sólo colonizadores o contaminantes.

Microscópicamente aparecen como bacilos largos y finos que en medios, fundamentalmente líquidos se asocian y forman los característicos “nidos de pájaros”. Esta especie es de crecimiento muy lento y tiene una temperatura óptima de incubación de 42-45°C. Esta propiedad, además de ayudar en la identificación, explica la capacidad de estos microorganismos para desarrollarse en los tanques y depósitos de agua caliente de los hospitales, y los múltiples brotes de infección nosocomial a los que han dado lugar.

3.4. MNT DE CRECIMIENTO RÁPIDO (MCR)

Hasta hace unos años, *M. fortuitum* y *M. chelonae* constituían los dos únicos complejos o grupos de micobacterias de crecimiento rápido con cierta relevancia clínica. Posteriormente se han subdividido

en nuevas especies con diferentes implicaciones patogénicas y de sensibilidad a los antimicrobianos. Es de destacar la importancia que pueden tener estas especies en patología nosocomial, la resistencia que muestran a los antituberculosos habituales y la necesidad, por tanto, de emplear para su tratamiento otros antibióticos utilizados más comúnmente en la práctica clínica habitual.

3.4.1. *Mycobacterium abscessus*. Es una micobacteria no cromógena de desarrollo muy rápido en medios convencionales y que ha estado asociada durante años a *M. chelonae* bajo la denominación de complejo *M. fortuitum* o *M. fortuitum-chelonae*. En la actualidad se puede diferenciar fácilmente por la utilización del citrato, el patrón de sensibilidad a los antimicrobianos y, sobre todo, mediante la PCR-RFLP del gen *hsp65*, entre otras técnicas moleculares. Es un microorganismo ubicuo en la naturaleza que puede aislarse de diferentes hábitat acuáticos y del suelo, pudiendo contaminar los suministros de agua, reactivos y soluciones de lavado de los hospitales. Ello es debido a su capacidad para sobrevivir en ausencia de nutrientes y en un amplio margen de temperaturas. Suelen causar infecciones pulmonares crónicas y también, infecciones de heridas quirúrgicas o tras inyecciones, infección asociada a catéteres, a dispositivos de hemodiálisis, etc., así como infecciones diseminadas en pacientes inmunodeprimidos.

3.4.2. *Mycobacterium chelonae*. Esta especie fue aislada por primera vez en una tortuga (*Chelona corticata*). En la actualidad, *M. chelonae* es una de las MNT de crecimiento rápido patógenas que muestran una mayor resistencia a los antimicrobianos y que se aísla con más frecuencia en pacientes inmunodeprimidos. A diferencia de *M. abscessus* la afectación pulmonar crónica es rara. El cuadro clínico más frecuente es la enfermedad cutánea, a veces diseminada, fundamentalmente en pacientes con tratamiento inmunosupresor por trasplantes de órgano sólido, artritis reumatoide u otros procesos autoinmunes. Además, *M. chelonae* puede causar infecciones localizadas postraumáticas (celulitis, abscesos y osteomielitis). También, aunque en menor proporción que *M. abscessus* y *M. fortuitum*, puede estar implicado en infecciones de piel y partes blandas, de heridas quirúrgicas, incluidas las inyecciones, así como las relacionadas con catéteres intravasculares.

3.4.3. *Mycobacterium fortuitum*. *Mycobacterium ranae* fue la denominación inicial de esta especie al describirse por primera vez en 1905 en ranas. Posteriormente se le dio el nombre actual al aislarse, en 1938, en unos abscesos subcutáneos tras unas inyecciones de vitaminas. Clásicamente, en el grupo *M. fortuitum*, se han incluido tres taxones: *M. fortuitum*, *M. peregrinum* y *M. fortuitum* biovariedad 3, hoy en día considerados especies diferentes. Recientemente a esta última se le ha denominado *M. porcinum*.

M. fortuitum puede causar, de forma esporádica,

infecciones de heridas quirúrgicas y traumáticas, osteomielitis, celulitis y, entre otras, las relacionadas con catéteres intravasculares. Las infecciones pulmonares y diseminadas son infrecuentes.

3.4.4. *Mycobacterium peregrinum*. Anteriormente considerada una biovariedad de *M. fortuitum*. De momento, no se conoce el significado clínico real de esta bacteria, sin embargo, en un pequeño número de casos se ha notificado que esta especie ha sido el agente causal de infecciones esporádicas en pulmón y heridas de localización esternal y cutáneas. Se ha observado que se trata de una especie más sensible a los antimicrobianos que *M. fortuitum*.

3.4.5. *Mycobacterium mucogenicum* y otras micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido. *M. mucogenicum* debe su nombre al aspecto mucoso de sus colonias. Aunque se ha recuperado con cierta frecuencia en agua de consumo humano y en esputos, constituyendo una simple contaminación, se ha notificado su capacidad patógena al asociarse con diversos brotes nosocomiales en pacientes sometidos a diálisis, así como infecciones relacionadas con catéteres intravasculares y heridas postraumáticas.

En los últimos años se han descrito numerosas especies de micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido con implicaciones en patología humana: *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. mageritense*, *M. septicum*, *M. houstonense*, *M. bonickei*, *M. brisbanense*, *M. neworleansense*, *M. alvei*, *M. brumae*, *M. canariensis*, *M. goodii* y *M. wolynskii*. Muchas de ellas se han descrito a partir de variantes de especies ya conocidas como *M. smegmatis* o *M. porcinum*. En ellas se han observado algunas diferencias en la sensibilidad antimicrobiana y, especialmente, genéticas que permiten la caracterización de las mismas.

3.5. OTRAS MNT

Algunas MNT de crecimiento lento se aíslan con cierta frecuencia en los laboratorios de microbiología pero suelen ser meros contaminantes. Entre ellas se encuentran *M. gordonae* y el complejo *M. terrae*, que se compone de: *M. terrae*, *M. nonchromogenicum* y *M. triviale*.

En la última década, con la introducción de los métodos genéticos de identificación, se han ido describiendo nuevas especies que, a pesar del reducido número de cepas notificadas hasta la fecha, muchas de ellas parecen tener cierta relevancia clínica (tabla 2).

4. MUESTRAS: SELECCIÓN, RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Las muestras remitidas al laboratorio deben cumplir una serie de condiciones generales de las que depende la calidad y eficiencia de los resultados microbiológicos: indicación correcta del estudio de micobacterias,

selección de la muestra más representativa y rentable, recogida de forma estéril en cantidad suficiente y si es posible antes del inicio del tratamiento antimicobacteriano. No deben utilizarse fijadores ni sustancias conservantes. Tampoco es recomendable emplear escobillones, hisopos o torundas de algodón. Las muestras se deben recoger y enviar en contenedores estériles, de un solo uso y con cierre hermético. El procesamiento de la muestra debe ser inmediato para evitar el sobrecrecimiento de la microbiota acompañante; de lo contrario, debe guardarse en frigorífico (2-8°C) hasta dicho momento, salvo los hemocultivos que deben conservarse en estufa o bien a temperatura ambiente. En la actualidad no se recomiendan las recolecciones de 24 horas por la posible dilución de las muestras con una mayor concentración bacilar y el aumento de la contaminación bacteriana y fúngica.

4.1. SELECCIÓN DE LA(S) MUESTRA(S).

Dependerá en gran medida de la sintomatología del paciente y de su enfermedad de base, así como del centro sanitario e infraestructura disponible. Como regla general se intentará obtener las muestras más sencillas y con métodos no invasores. En principio, cualquier tipo de muestra puede enviarse para su estudio micobacteriológico. Sin embargo, la gran mayoría serán de origen respiratorio ya que las patologías más frecuentes ocurren en esta localización anatómica. Aunque el cultivo de muestras respiratorias es fundamental para el diagnóstico de la tuberculosis, su utilización, al igual que el de las muestras digestivas (heces) para determinadas especies micobacterianas, como es el complejo *M. avium*, es mucho más controvertido, al poder tratarse tan sólo de una colonización. Por ello, sin sospecha clínica, no es recomendable el cultivo rutinario e indiscriminado de heces y de muestras respiratorias en pacientes VIH seropositivos.

Especial mención precisa la sospecha de infección diseminada por micobacterias. Esta requerirá el cultivo de muestras de territorios estériles. La sangre es la mejor muestra para su detección. El número de hemocultivos requerido para el diagnóstico es un tema aún en debate. Un solo hemocultivo tiene una sensibilidad del 90-95%. No obstante, parece razonable repetir el cultivo tras 1 ó 2 semanas si persiste la sospecha clínica de infección diseminada. Tras la sangre, la médula ósea es la muestra de mayor rendimiento. Su obtención para otros posibles diagnósticos debe acompañarse siempre de la búsqueda de micobacterias. Los laboratorios que no puedan procesar estas muestras pueden optar por enviarlas a su centro de referencia o bien, alternativamente tomar muestras de biopsias de ganglios linfáticos, bazo e hígado, fundamentalmente.

Tabla 2. Micobacterias no tuberculosas (MNT) de reciente aparición y potencialmente patógenas.

Especie (año)	Aislamiento	Afectación clínica
MNT de crecimiento lentas no cromógenas		
<i>M. branderi</i> (1995)	Muestras respiratorias	Enfermedad pulmonar, tenosinovitis ulcerativa
<i>M. heidelbergense</i> (1997)	Ganglios linfáticos	Linfadenitis cervical en niños
<i>M. lacus</i> (2002)	Agua, tejido sinovial	Bursitis postraumática
<i>M. triplex</i> (1996)	Espudo, LCR, ganglios linfáticos	Enfermedad pulmonar crónica, infección diseminada en SIDA, linfadenitis cervical en niños
MNT de crecimiento lento escotocromógenas		
<i>M. bohemicum</i> (1998)	Espudo, ganglios linfáticos, agua	Linfadenopatía en niños
<i>M. celatum</i> (1993)	Muestras respiratorias, ganglios linfáticos	Enfermedad pulmonar, enfermedad diseminada en SIDA, linfadenopatía en niños
<i>M. conspicuum</i> (1995)	Espudo, líquido pleural, piel, heces, sangre	Enfermedad diseminada en inmunodeprimidos
<i>M. heckeshornense</i> (2000)	Espudo, biopsia de pulmón	Enfermedad pulmonar (cavitación e infiltrado)
<i>M. interjectum</i> (1993)	Ganglios linfáticos	Linfadenitis cervical crónica en niños
<i>M. lentiflavum</i> (1996)	Ganglios linfáticos, esputo, aspirado gástrico, biopsia disco vertebral, orina, sangre	Linfadenitis cervical en niños, enfermedad pulmonar cavitada, espondilodiscitis, infección diseminada (SIDA)
<i>M. palustre</i> (2002)	Espudo, ganglios linfáticos, agua	Linfadenopatía en niños
<i>M. tusciae</i> (1999)	Ganglios linfáticos, agua	Linfadenitis cervical en niños inmunodeprimidos
MNT de crecimiento lento fotocromógenas		
<i>M. intermedium</i> (1993)	Espudo	Bronquitis crónica en inmunodeprimidos
MNT de crecimiento rápido no pigmentadas		
<i>M. bonickei</i> (2004)	Exudados, biopsias de hueso o de partes blandas	Infecciones de herida quirúrgica, osteomielitis, infecciones de heridas postraumáticas
<i>M. brisbanense</i> (2004)	Exudados, biopsias de hueso o de partes blandas	Infecciones de herida quirúrgica, osteomielitis, infecciones de heridas postraumáticas
<i>M. goodii</i> (1999)	Exudados, biopsias, muestras respiratorias	Celulitis, bursitis, osteomielitis, infecciones de heridas postraumáticas, infección quirúrgica, infección pulmonar crónica
<i>M. houstonense</i> (2004)	Exudados, biopsias de hueso o de partes blandas	Infecciones de herida quirúrgica, osteomielitis, infecciones de herida postraumáticas
<i>M. immunogenum</i> (2001)	Sangre, exudados, muestras respiratorias, raspado corneal, líquido sinovial,	Infecciones relacionadas con catéter, infección diseminada, queratitis, infección respiratoria, artritis
<i>M. mageritense</i> (1997)	Espudo, sangre, exudados	Infecciones quirúrgicas y de catéter, sinusitis grave
<i>M. neworleansense</i> (2004)	Exudados, biopsias de hueso o de partes blandas	Infecciones de herida quirúrgica, osteomielitis, infecciones de herida postraumáticas
<i>M. septicum</i> (2000)	Sangre	Bacteriemia relacionada con catéter
<i>M. wolinskyi</i> (1999)	Exudados, biopsias	Celulitis, osteomielitis, infecciones de heridas quirúrgicas
MNT de crecimiento rápido fotocromógenas		
<i>M. novocastrense</i> (1997)	Biopsia cutánea	Lesión granulomatosa cutánea en niño

4.2. MUESTRAS RESPIRATORIAS.

El *esputo simple* o espontáneo es la muestra más frecuente y rentable. Debe recogerse por las mañanas, cuando existe una mayor concentración bacilar y en ayunas. Son suficientes tres muestras de 5-10 ml, recogidas en días consecutivos. En caso de no conseguir una expectoración espontánea será necesario *inducir* el esputo mediante “claping” o nebulizaciones con soluciones salinas. En estos casos, la obtención del esputo habrá que realizarla en habitaciones bien ventiladas o espacios abiertos donde pueda realizarse un cierto aislamiento respiratorio de los enfermos. Es importante que se informe al laboratorio del tipo de esputo enviado, ya que los inducidos tienden a ser más acuosos. Aunque el esputo hemoptoico pueda ser clínicamente orientativo, la sangre del mismo puede interferir el rendimiento diagnóstico. No obstante, cuando no se disponga de otro, éste se debe procesar.

De las muestras obtenidas por *técnicas broncoscópicas* (broncoaspirado, lavado broncoalveolar y cepillado bronquial con catéter telescopado) se deben enviar al menos 5 ml para su estudio, teniendo en cuenta que deben procesarse lo antes posible ya que la lidocaína, anestésico utilizado frecuentemente en la broncoscopia, inhibe el crecimiento de estas bacterias. Respecto a las *biopsias respiratorias*, tanto las bronquiales como las transbronquiales, pulmonares, pleurales y otras, se precisa un mínimo de 1 g de tejido.

El *jugo gástrico* es una buena muestra indicada fundamentalmente en niños o adultos en los que no es posible la obtención de un esputo adecuado y como alternativa a las muestras broncoscópicas. La aspiración gástrica se realizará a primera hora de la mañana, cuando todavía no ha comenzado el peristaltismo intestinal que eliminaría rápidamente los bacilos micobacterianos deglutidos durante la noche. Además, debido a la acidez del jugo gástrico, se requiere un envío y procesamiento rápido. En caso de no llevarse a cabo en las 4 horas siguientes a su recogida es conveniente neutralizarlo (ej., 100 mg de carbonato sódico).

4.3. SANGRE.

Se recomienda inocularla en los medios de cultivo de los nuevos sistemas automáticos no radiométricos o bien utilizar técnicas de lisis-centrifugación (*Isolator system*). Aunque el medio 13A del sistema radiométrico BACTEC 460 ha demostrado una gran rentabilidad, este va a dejar de estar disponible en un futuro próximo. Si la sangre precisa ser transportada antes de su cultivo debe anticoagularse mediante polianetolsulfonato sódico (SPS) o heparina, pero no con EDTA. Con el sistema *Isolator* la muestra puede permanecer sin procesarse varios días, aunque es recomendable no exceder las 24 horas.

4.4. LÍQUIDOS ESTÉRILES (CEFALORRAQUÍDEO, ARTICULAR, PERITONEAL, PLEURAL, PERICÁRDICO, ETC.).

Siempre debe recogerse el mayor volumen posible (10 a 15 ml), debido al bajo número de bacilos presente. Como algunos líquidos (ej., articulares) contienen una elevada cantidad de fibrinógeno, este tipo de muestras deberían recogerse en un tubo con anticoagulante.

4.5. TEJIDOS (BIOPSIAS).

Para evitar la deshidratación de las muestras de biopsia, éstas deben enviarse al laboratorio en suero fisiológico o bien, en medio líquido 7H9 de Middlebrook. Nunca debe utilizarse formol ya que haría inviables a las micobacterias. Por ello, se debe distinguir claramente entre las muestras enviadas al laboratorio de anatomía patológica y al de microbiología. Las muestras de médula ósea se obtendrán y procesarán como si de un hemocultivo se tratara.

4.6. ORINA.

Se debe recoger la muestra a primera hora de la mañana obtenida por micción espontánea, sonda urinaria o punción suprapúbica, siguiendo las mismas precauciones que en la obtención de cualquier urocultivo. Es aconsejable recoger tres muestras (mínimo de 40 ml) durante tres días consecutivos.

4.7. HECES.

Se recomienda el estudio de tres muestras de al menos 1 g cada una. Su procesamiento debería ser inmediato. Para ello se añaden 5 ml de medio líquido 7H9 de Middlebrook o suero fisiológico a la muestra antes de iniciar la digestión-descontaminación pertinente.

5. MICROSCOPIA

A pesar de que en los últimos años la micobacteriología ha experimentado importantes avances tecnológicos, el diagnóstico precoz de infección por micobacterias y, especialmente de tuberculosis, sigue recayendo en el examen microscópico de las muestras clínicas teñidas de manera adecuada. En la actualidad, es el procedimiento más simple, barato y rápido en proporcionar al clínico una orientación diagnóstica preliminar. El examen microscópico permite valorar la calidad de las muestras recibidas, identificar los pacientes más contagiosos, y además resulta útil para monitorizar la respuesta de los pacientes al tratamiento antimicobacteriano.

En general, la microscopía, por sus características, debe aplicarse sistemáticamente sobre cualquier muestra clínica en la que sea preciso descartar estos patógenos, con la excepción, tal vez, de la sangre. Sin embargo, una tinción negativa no descarta una posible infección micobacteriana subyacente.

5.1. TINCIONES.

Las micobacterias son microorganismos difíciles de teñir con los colorantes básicos habituales. Esto se debe a alto contenido de lípidos de su pared celular, en especial ácidos grasos de cadena larga (ácidos micólicos). Para lograr la penetración del colorante primario al interior de la micobacteria se debe recurrir al calor o a determinados detergentes según el método utilizado. Una vez dentro, el colorante no podrá ser extraído tras la exposición al alcohol-ácido o ácidos minerales. Esta propiedad se denomina ácido-alcohol resistencia (AAR) y es útil para la visualización de este grupo específico de bacterias. Se desconoce la naturaleza exacta del mecanismo de AAR aunque se piensa que el fenol permite la penetración del colorante, que se ve facilitada por el efecto del calor. Además, las micobacterias son capaces de formar complejos estables con ciertos colorantes arilmetanos como la fucsina o la auramina O.

Los métodos más utilizados para determinar la AAR de las micobacterias son: a) Las tinciones basadas en la utilización de fucsina fenicada (carbolfucsina) como colorante primario. Estas son, la clásica de Ziehl-Neelsen o variantes como la de Kinyoun, donde los microorganismos se tiñen de rojo sobre un fondo azul o verde, dependiendo del contracolorante utilizado. La variante de Kinyoun o coloración fría, emplea cuerpos tensoactivos sin necesidad de calentar el colorante; y b) Métodos que utilizan como colorante primario determinados fluorocromos (auramina O, auramina-rodamina) donde los microorganismos que son AAR, bajo la luz ultravioleta, aparecen fluorescentes de color amarillo o naranja dependiendo del filtro empleado. La diferencia básica entre ambos métodos radica en el aumento microscópico requerido y por tanto el número de campos a visualizar. De esta forma, los métodos con carbolfucsina precisan el examen con un ocular-objetivo de inmersión de gran aumento (x 1.000). En cambio, las técnicas fluorescentes requieren menos esfuerzo al poder observar la preparación con un ocular-objetivo de menor aumento (x 250) sin pérdida de sensibilidad. Ello permite una mayor rapidez de lectura y un menor cansancio del microscopista, siendo por tanto el método de cribado recomendado en los laboratorios con un gran número de muestras. No obstante, cuando exista la menor duda con las técnicas fluorescentes se deberá confirmar mediante una tinción de Ziehl-Neelsen.

5.2. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.

La microscopía presenta una sensibilidad inferior al cultivo, oscilando entre un 22% y un 80%. Existen diversos factores condicionantes que intervienen en la misma: a) *Tipo de muestra*. Las de origen respiratorio son las de mayor rentabilidad, seguidas de las muestras tisulares; b) *La cantidad de muestra procesada*; c) *La concentración de bacterias* en la muestra. Para que una tinción sea positiva debe

contener 10⁵ bacterias por ml de muestra. Así, en los líquidos de territorios estériles, que suelen tener un número bajo de microorganismos, la microscopía es muy poco rentable. Por ello, algunos autores recomiendan en este tipo de muestras llevar a cabo técnicas de concentración. Aunque la centrifugación parece la primera opción plausible, no es totalmente eficaz debido a que la densidad de flotación de las micobacterias está próxima a 1, lo que hace que muchas de ellas permanezcan en el sobrenadante. Sin embargo, si parecen eficaces la superposición secuencial en un portaobjetos de varias gotas del fluido corporal no centrifugado o la filtración mediante una membrana de policarbonato; d) *El tipo de tinción* realizado. Es conocido que la tinción de Kinyoun es la que ofrece una menor rentabilidad, mientras que la tinción con fluorocromos, además de requerir un menor tiempo de observación, siempre se la ha considerado el de mayor sensibilidad. No obstante, en la actualidad este último aspecto es bastante controvertido y no parece que en sensibilidad supere a la tinción de Ziehl-Neelsen; e) *La especie micobacteriana* presente. Las micobacterias no tuberculosas se detectan con menor frecuencia y con mayor dificultad que *M. tuberculosis*. Además determinadas especies, como algunas de crecimiento rápido, no suelen teñirse adecuadamente con los fluorocromos. Por ello, en estas micobacterias se recomienda la tinción con carbolfucsina y una decoloración más suave; y f) *La experiencia del observador*.

Aunque la especificidad del examen directo de la muestra para determinar el género *Mycobacterium* es bastante elevada, la diferenciación de la especie a partir de la muestra clínica suele ser muy difícil. Por otro lado, no hay que olvidar que existen otros microorganismos que pueden presentar diferentes grados de AAR como son: *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordona*, *Legionella micdadei* y los ooquistes de *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Sarcocystis* y *Cyclospora*.

5.3. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA.

Cada preparación deberá examinarse exhaustivamente para descartar la presencia de microorganismos AAR. Cuando la muestra se haya teñido con carbolfucsina deberá examinarse un mínimo de 300 campos con el ocular-objetivo de inmersión (x 1.000) antes de emitir un informe negativo. Cuando se haya utilizado una tinción con fluorocromo el examen se hará con un microscopio de fluorescencia y a menor aumento (x 250). Al ampliar el campo visual será necesario observar menos campos (al menos 30) para informar la preparación como negativa.

En las extensiones de muestras positivas, los microorganismos pueden tener diferentes formas y tamaños. Así, el clásico *M. tuberculosis* aparece como bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) de 1 a 10 µm de largo y 0,2 a 0,6 µm de ancho. Estos pueden ser

rectos o ligeramente curvados y, en ocasiones, teñidos irregularmente debido a la presencia de unas granulaciones a lo largo de la bacteria, lo que es más destacable con la tinción de Ziehl-Neelsen. Los bacilos se pueden encontrar aislados o en pequeños grupos de pocos elementos. En ocasiones se pueden ver en grupos o masas mayores en forma de espigas. Esta morfología varía ligeramente de unas especies de micobacterias a otras, lo que ha llevado a intentar un diagnóstico de especie a partir de las características microscópicas. Sin embargo, esta tarea resulta bastante arriesgada y poco recomendable a partir de muestras clínicas, aun en el caso de personal entrenado y con experiencia. En cambio, en medio de cultivo líquido, la morfología microscópica se ha utilizado para la identificación presuntiva de algunas micobacterias frecuentes. Las especies del complejo *M. tuberculosis* exhiben a menudo un aspecto de “cuerdas serpenteantes” o “coronas de espinas”, pero también puede ocurrir con algunas MNT como, por ejemplo, *M. kansasii*. En general, las MNT pueden tener un aspecto pleomórfico, con formas cocoides o filamentosas y con agrupaciones variables. Así, *M. kansasii* suelen ser bacilos largos y gruesos que se tiñen irregularmente con bandas cruzadas, dándoles un aspecto arrosariado o atigrado muy característico y, pudiendo llegar a formar grumos de formas diversas. En cambio el complejo *M. avium* se muestran como cocobacilos de pequeño tamaño y que se encuentran dispersos sin ninguna asociación concreta. Otro ejemplo es *M. xenopi*, que se visualizan como bacilos largos y delgados que se agrupan formando estructuras en “nido de pájaro”.

5.4. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.

Todas las extensiones en las que no se hayan visualizado bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) deben informarse como negativas. En el caso de ver 1 ó 2 BAAR en toda la preparación, se debería registrar pero no informar, siendo recomendable confirmar el hallazgo con nuevas muestras. Todas las extensiones en las que se detecten varios BAAR deberán informarse como positivas, especificando el método de tinción empleado. Es recomendable archivar todas las preparaciones positivas.

Tabla 3. Interpretación e informe de la microscopia (baciloscopia) para la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).

Informe	Tipo de tinción, aumento óptico y nº de BAAR observados		
	Fucsina (x 1.000)	Fluorocromo (x 250)	Fluorocromo (x 450)
No BAAR	0	0	0
Dudoso (repetir)	1-2 / 300 campos (3 barridos)	1-2 / 30 campos (1 barrido)	1-2 / 70 campos (1,5 barridos)
Positivo 1 +	1-9 / 100 campos (1 barrido)	1-9 / 10 campos	2-18 / 50 campos (1 barrido)
Positivo 2 +	1-9 / 10 campos	1-9 / campo	4-36 / 10 campos
Positivo 3 +	1-9 / campo	10-90 / campo	4-36 / campo
Positivo 4 +	>9 / campo	>90 / campo	>36 / campo

Un aspecto importante del informe es la cantidad de BAAR observados. Para tratar de sistematizar la emisión de resultados se han propuesto diferentes esquemas que se resumen en la tabla 3.

5.5. FALSOS RESULTADOS.

a) Errores por defecto (falsos negativos): muestras no representativas (saliva en vez de esputo, volumen escaso de orina, jugo gástrico no tamponado, etc.), extensiones demasiado gruesas o finas, mala fijación de la extensión, mala calidad de los colorantes, exceso de decoloración, defectos de observación (pocos campos examinados, fatiga del observador, escasa atención o experiencia, etc.). b) Errores por exceso (falsos positivos): son los más graves, y pueden ser debidos a la presencia de restos de comida en el esputo, precipitados del colorante, contaminación cruzada de los portaobjetos durante las tinciones y/o uso de agua contaminada con micobacterias ambientales, contaminación a través del aceite mineral con el objetivo de inmersión (el objetivo debe limpiarse entre las preparaciones), o puede tratarse de otros microorganismos con propiedades de AAR. Un aspecto a tener en cuenta son los casos de descontaminación enérgica de las muestras en el laboratorio, ya que podría aparentar un falso positivo, cuando en realidad se ha provocado un falso negativo del cultivo.

6. PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS: DIGESTIÓN Y DESCONTAMINACIÓN

La mayoría de las muestras clínicas remitidas al laboratorio para descartar infección micobacteriana, proceden de *zonas no estériles* donde existe una compleja matriz orgánica contaminada con una gran variedad de microorganismos. Esto puede dificultar o impedir el normal desarrollo de las micobacterias. Por otro lado, aquellas muestras paucibacilares, como son los fluidos corporales, requieren una concentración que mejore la detección, tanto en el examen microscópico como en el cultivo.

Por todo ello, es necesario recurrir a un pretratamiento adecuado de las muestras clínicas (homogeneización, descontaminación y concentración) antes de la tinción y siembra en los medios de cultivo.

El elevado contenido lipídico de la pared de micobacteriana le confiere una mayor resistencia a los ácidos y bases fuertes que pueden ser utilizados como agentes descontaminantes de la flora acompañante. En principio, un procedimiento de descontaminación debería ser capaz de eliminar los contaminantes en la medida de lo posible sin afectar gravemente la viabilidad de las micobacterias. Sin embargo, todos los métodos actuales son tóxicos en algún grado para las mismas. Por otro lado, la digestión permite la homogeneización de la muestra ya que algunas, en particular los esputos, contienen moco que si no se licúa proporciona a las bacterias contaminantes una barrera de protección frente a la acción de los agentes descontaminantes.

La digestión-descontaminación sólo tiene sentido cuando se piensa que la muestra clínica está contaminada, por lo tanto los líquidos orgánicos estériles y los tejidos recogidos asépticamente no la precisan. Si existen dudas en cuanto a la necesidad de descontaminar o no, podría optarse por refrigerar la muestra 24 h hasta disponer del resultado preliminar de los cultivos bacteriológicos rutinarios de la misma.

Existen numerosos protocolos de descontaminación: método de Petroff (hidróxido sódico), Kubica-Krasnow (cisteína y cloruro de benzalconio) y Tacquet y Tison (hidróxido sódico y laurilsulfato de sodio) entre otros. Algunos de ellos utilizan un mismo reactivo para digerir y descontaminar. Por desgracia, no existe un método ideal que sirva para todas las muestras clínicas, medios de cultivo y técnicas diagnósticas utilizadas.

El hidróxido sódico es el agente descontaminante más empleado que posee, además, propiedades mucolíticas. Al tratarse de un álcali muy potente resulta crítica la concentración empleada, así como el tiempo de actuación. Una descontaminación agresiva matará del orden del 20 al 90% de las micobacterias presentes en una muestra clínica.

La N-acetil-L-cisteína es la sustancia mucolítica que más se utiliza. A pesar de que no tiene efecto inhibitorio directo sobre las bacterias, permite trabajar con concentraciones de hidróxido sódico más bajas cuando se utilizan de forma conjunta. La combinación N-acetil-L-cisteína más NaOH al 2% es el método de descontaminación-digestión más difundido y el recomendado para la mayoría de los sistemas de cultivo automáticos con medios líquidos.

Para lograr el máximo rendimiento en la recuperación de micobacterias, se deberían tener presentes las limitaciones de los diferentes métodos de descontaminación usados. Así, algunas sustancias interfieren negativamente con algunos medios de cultivo. Un ejemplo es la combinación de laurilsulfato de sodio con NaOH que interfiere con el medio MGIT (*Mycobacterial Growth Indicator Tube*). Otros agentes descontaminantes impiden el crecimiento de determinadas micobacterias, como es el caso del

hidróxido sódico, el ácido oxálico y en menor medida el ácido clorhídrico, que tienen un efecto deletéreo sobre *M. ulcerans*. Cuando en un laboratorio se realicen simultáneamente técnicas de amplificación genómica a partir de muestras pretratadas, conviene cerciorarse de que ninguna de las sustancias empleadas en el procedimiento de descontaminación-digestión interfiera con la reacción de amplificación.

En general cada laboratorio deberá utilizar el método de digestión-descontaminación que mejor se adapte a sus necesidades y en consonancia con los sistemas de cultivo e identificación (tabla 4). Para optimizar y controlar el procedimiento utilizado se deberá analizar con una determinada periodicidad el número de cultivos contaminados. Aunque clásicamente el ideal recomendado se encuentra entre el 3-5% se debe tener en cuenta el tipo de muestra y el o los medios de cultivo utilizados, entre otros factores. En la práctica diaria estos márgenes deberían ser únicamente orientativos.

Cuando existe un número elevado de contaminaciones en relación con el pretratamiento de las muestras se pueden adoptar diversas estrategias: a) Incrementar la concentración del descontaminante. Ello debe realizarse progresivamente y teniendo en cuenta que concentraciones del 4% de hidróxido sódico elimina, en poco tiempo, la mayoría de las micobacterias, b) Utilización simultánea de medios selectivos que inhiban el crecimiento de contaminantes potenciales (bacterias u hongos), c) Verificar la completa digestión de las muestras. En caso contrario incrementar la concentración de N-acetil-L-cisteína en las muestras con excesivo moco, d) En las muestras problemáticas, se puede optar por procedimientos alternativos de descontaminación-digestión. Por ejemplo, las muestras procedentes de pacientes con fibrosis quística suelen presentar *Pseudomonas*. Ello puede combatirse añadiendo ácido oxálico al 5% al sedimento concentrado tras la descontaminación-digestión con N-acetil-L-cisteína y NaOH.

7. CULTIVO

El aislamiento de micobacterias a partir del cultivo de muestras clínicas continúa siendo fundamental para el diagnóstico específico de las infecciones por estos microorganismos. El cultivo ha demostrado ser más sensible (10^1 - 10^2 bacterias viables/ml) que el examen microscópico. Además, el aislamiento del agente causal permite la identificación de la especie, los posteriores estudios de sensibilidad frente a los antimicrobianos, así como la monitorización del tratamiento y curación del paciente.

Las micobacterias suelen ser bastante exigentes y requieren medios ricos y frescos.

Existen medios *selectivos* con diversos antibióticos para prevenir el crecimiento de la flora bacteriana o fúngica acompañante.

Tabla 4. Métodos de digestión y descontaminación de las muestras clínicas.

Método	Agente(s)	Comentarios
Kubica	N-acetil-L-cisteína (NALC) e hidróxido sódico (NaOH) al 2%	Descontaminación suave. La concentración de NaOH puede aumentarse al 3% en caso de un exceso de contaminación. La NALC debe prepararse diariamente. Límite de exposición al NaOH de 15 min. Es el método más difundido, especialmente en EE UU.
Tacquet y Tison	Laurilsulfato sódico al 3% y NaOH al 1%	Descontaminación suave. Aconsejable cultivar en medios con huevo para neutralizar los restos del detergente. Algunos autores describen su superioridad respecto al NALC-NaOH. Por el contrario, parece ser incompatible con el BACTEC y los sistemas automáticos de cultivo no radiométricos. Método bastante utilizado en Europa.
Petroff	NaOH al 4%	Descontaminación agresiva con efecto homogeneizante a dicha concentración. Requiere control riguroso del tiempo de exposición (≤ 15 min).
Karlson	Fosfato trisódico al 13% y cloruro de benzalconio (Zefiran)	Ideal en laboratorios que no pueden controlar el tiempo de exposición. Precisa sembrarse en medios con huevo o neutralizar el Zefiran con lecitina. No debe emplearse con los sistemas automáticos y puede resultar lesivo para el complejo <i>M. avium</i> (CMA).
Löwenstein-Sumiyoshi	Acido sulfúrico al 4-5%	Útil en muestras que sólo precisen descontaminación. Práctico en laboratorios con gran volumen de orinas.
Corper y Uyei	Acido oxálico al 5%	El más efectivo en muestras contaminadas con <i>Pseudomonas</i> y en la recuperación de CMA a partir de heces.
Smithwick	Cloruro de cetil-piridinio al 1% y CINA al 2%	Descontaminación suave. Útil para el transporte de muestras. Requiere un mínimo de 24 h de exposición. Debe sembrarse en medios con huevo o previa neutralización del amonio cuaternario.

Aunque los medios *no selectivos* no contienen antibióticos, poseen algunas sustancias inhibitorias para el control de bacterias contaminantes, como son los colorantes de anilina (verde de malaquita o cristal violeta). Su concentración suele ser crucial para mantener el equilibrio entre la recuperación micobacteriana deseada y la posible contaminación a partir de las muestras de territorios no estériles. Si la concentración es muy elevada puede llegar a afectar seriamente el crecimiento micobacteriano.

En general, para el aislamiento primario a partir de muestras clínicas se prefieren medios *no selectivos*, *líquidos* y, a ser posible, la combinación de uno *líquido* y uno *sólido*.

7.1. MEDIOS SÓLIDOS.

Se pueden dividir en dos grupos básicos: medios con huevo o con agar.

7.1.1. Medios sólidos con huevo. Son medios ricos que contienen huevo (entero o sólo yema), fécula de

patata, sales, glicerol y un agente inhibidor como es el verde de malaquita. Las ventajas fundamentales radican en la buena recuperación de gran parte de las especies micobacterianas y su buena capacidad tanto, inhibitoria de la flora contaminante, como tamponante que permite neutralizar múltiples productos tóxicos presentes en las muestras clínicas, así como algunos restos de diversos productos descontaminantes. Además, poseen una vida media prolongada cuando se conservan a 2-8 °C (6 meses) y las pruebas fenotípicas de identificación, realizadas a partir de subcultivos provienen de estos medios, son bastante fidedignas. Sin embargo, son medios difíciles de preparar (coagulación a 85-95 °C) lo que conlleva algunas variaciones de un lote a otro. Esto puede influir en la concentración final de los antimicrobianos en las pruebas de sensibilidad *in vitro*. También presentan, a veces, algunos problemas para distinguir entre los restos del inóculo y el crecimiento micobacteriano. Por último, cuando se contaminan se afecta todo el medio pudiendo llegar a licuarse.

El medio más utilizado es el Löwenstein-Jensen, aunque existen otros en virtud de su mayor (Petragrani) o menor capacidad inhibitoria de la flora acompañante (Coletsos o American Thoracic Society) que depende tan sólo de la concentración de verde de malaquita.

7.1.2. Medios sólidos con agar. Estos medios sintéticos, tipo 7H10 y 7H11 de Middlebrook, son transparentes y permiten una detección rápida del crecimiento micobacteriano (10-12 días) que puede distinguirse de los residuos de la muestra en la siembra. Además se pueden utilizar para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. La inclusión de un 2% de glicerol permite un mejor crecimiento del complejo *M. avium-intracellulare*. El medio 7H11 contiene un 0,1% de hidrolizado de caseína que favorece la recuperación de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la isoniacida. Los principales inconvenientes residen en un precio superior a los medios con huevo, una vida media corta (1 mes a 2-8 °C) y una mayor tasa de contaminaciones al contener una concentración menor de verde de malaquita. El almacenaje es delicado ya que un exceso de temperatura o exposición a la luz puede deteriorar el medio y estimular la producción de formaldehído que es tóxico para las micobacterias.

7.1.3. Medios selectivos. Son medios no rutinarios con o sin huevo que contienen agentes antimicrobianos para inhibir la contaminación bacteriana y/o micótica acompañante. Cuando se decida utilizarlos, debería hacerse en combinación con un medio no selectivo.

7.1.4. Medios especiales. Algunas micobacterias requieren enriquecimientos especiales, como ocurre en *M. haemophilum*, donde un suplemento de hemina, hemoglobina o citrato amónico férrico es necesario.

7.2. MEDIOS BIFÁSICOS.

El medio más conocido es el sistema Septi-Chek que consiste en una botella con un medio líquido (7H9 de Middlebrook) y suplementos antibióticos y de enriquecimiento, al que se le añade en la parte superior de la botella diversos medios sólidos (agar chocolate, Löwenstein-Jensen, 7H10 ó 7H11 de Middlebrook). Esto permite distinguir las contaminaciones y los cultivos mixtos. Además es posible obtener un crecimiento adecuado tanto en la fase líquida como sólida para la identificación, sin requerir un subcultivo posterior. En conjunto, sin llegar a la rapidez de detección de los sistemas automáticos o semiautomáticos, obtiene una sensibilidad similar a éstos y mejora ostensiblemente el rendimiento de los medios convencionales. Por lo tanto, este medio representa una buena opción para los laboratorios con bajo número de muestras, al ser algo más económico y no precisar un gran equipamiento. Sin embargo, no permite llevar a cabo estudios de sensibilidad a los antimicrobianos.

7.3. MEDIOS LÍQUIDOS.

En general, son medios muy enriquecidos que recuperan un mayor número de micobacterias y más rápidamente que los medios sólidos. Por ello se aconseja incluirlos siempre para el aislamiento primario de muestras clínicas. Además estos medios se utilizan como base para diversas pruebas de identificación bioquímica y de sensibilidad a los antimicrobianos. Por el contrario, tienen la desventaja de no poder visualizar la morfología de la colonia ni valorar los posibles cultivos mixtos. Aparte de los clásicos 7H9 de Middlebrook, Dubos, Youmans, Proskauer-Beck, etc., existen una serie de sistemas comerciales que, utilizando la base de los convencionales, logran un alto rendimiento. Los objetivos actuales para el cultivo de micobacterias, se basan en la utilización de sistemas totalmente automatizados de incubación y lectura, y en los que pueden realizarse pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos.

7.3.1. Medios de lectura manual. Aunque los medios convencionales se pueden confeccionar en el propio laboratorio, existen medios comercializados que intentan facilitar la lectura para una rápida detección del crecimiento bacteriano. Los más utilizados son el MB Redox y el MGIT, que ofrecen una rentabilidad superior a los medios sólidos y pueden ser una alternativa en laboratorios con un número bajo de muestras.

7.3.1.1. MB Redox. Se basa en el medio de Kirchner con unos suplementos de antibióticos y de enriquecimiento. Para la detección del crecimiento micobacteriano incorpora una sal de tetrazolio como indicador redox. Cuando existe un crecimiento activo, la sal se reduce y precipita en la pared bacteriana. Esto produce unas partículas de color rosa o violeta que se pueden ver directamente. Se trata, por tanto, de un medio simple, fácil de usar y que no precisa instrumentación especial alguna.

7.3.1.2. MGIT (*Mycobacterial Growth Indicator Tube*). Es un medio fluorométrico basado en un 7H9 de Middlebrook con un componente fluorescente (pentahidrato de rutenio) embebido en silicona. Bajo la luz ultravioleta el crecimiento se aprecia mediante la visualización de un brillo fluorescente anaranjado en la superficie y en el fondo del tubo como consecuencia de una depleción de O₂. Es un medio sencillo que permite la lectura manual simultánea de diversos cultivos sin necesitar, al igual que el MB redox, un gran equipamiento, salvo una fuente de luz ultravioleta. Sin embargo, el MGIT tiene el inconveniente de requerir una mayor manipulación, ya que se le deben añadir los suplementos de antibióticos y de enriquecimiento, y éstos, al no utilizar agujas ni jeringuillas, deben añadirse con una pipeta, teniendo que abrir los tapones de rosca de los tubos. Por otro lado, ello le permite tener una vida media mayor que el MB redox que, al tener ya incorporados los suplementos debe, además, conservarse refrigerado (2-8°C). El tubo de MGIT es el mismo que se emplea en el sistema

automático de cultivo y detección MGIT 960. Asimismo, puede utilizarse para las pruebas de sensibilidad de *M. tuberculosis* a los antimicobacterianos de primera línea.

7.3.2. Sistemas de detección automática o semiautomática. La introducción del BACTEC 460 TB en la década de los ochenta revolucionó el cultivo de estos microorganismos, mejorando la recuperación de todo tipo de micobacterias y disminuyendo considerablemente el tiempo de detección de las mismas. A pesar de ser el patrón de referencia desde entonces, sus problemas, sobre todo, derivados de la utilización de isótopos radiactivos, han llevado al desarrollo de nuevos sistemas automatizados no radiométricos como son: ESP II System, MB/BacT ALERT 3D y MGIT 960. Aunque estos sistemas presentan un mayor número de contaminaciones, la rentabilidad global obtenida hasta la fecha es comparable al sistema radiométrico. Además de no utilizar isótopos radiactivos, presentan otras importantes ventajas como son: la automatización, la sencillez y la desaparición de la posible contaminación cruzada al tener métodos de detección que no implican una manipulación del contenido de los tubos.

7.3.2.1. Sistema BACTEC 460TB. Es un sistema semiautomático de cultivo y detección del crecimiento micobacteriano para todo tipo de muestras, incluidas las hemáticas. Utiliza el medio líquido 7H12 de Middlebrook que es un caldo base de 7H9 de Middlebrook que contiene ácido palmítico marcado con ^{14}C . Tras ser metabolizado el substrato por la bacteria, libera $^{14}\text{CO}_2$ a la fase aérea que se mide por el aparato y cuyo índice refleja la cantidad de microorganismo existente en el medio. Este método puede utilizarse también para la identificación presuntiva (utilizando p-nitro-amino-hidroxipifenona -NAP) y pruebas de sensibilidad. No obstante, aunque sigue siendo útil, especialmente para las pruebas de sensibilidad, presenta las desventajas de, sobre todo, utilizar isótopos radiactivos (^{14}C), no estar automatizado, contaminación cruzada potencial, posible producción de aerosoles durante la manipulación y lectura, y tener un precio elevado. En la actualidad esta siendo sustituido por los sistemas automatizados no radiométricos que se detallan a continuación.

7.3.2.2. Sistema ESP Culture System II. Es un sistema automático no radiométrico de monitorización continua, para la detección y determinación de la sensibilidad de micobacterias. El medio base consta de un 7H9 de Middlebrook con suplementos antibióticos y de enriquecimiento y unas esponjas de celulosa incluidas en el medio para ofrecer un hábitat natural y mayor superficie de cultivo. La detección se realiza mediante sensores de presión que detectan el consumo de oxígeno. El sistema efectúa lecturas cada dos horas generando un gráfico para cada cultivo y a través de un sistema experto determina si el cultivo es positivo o negativo. Tiene capacidad para 1920 cultivos

simultáneos. Admite cualquier método clásico de descontaminación y puede utilizarse para todo tipo de muestras, incluyendo sangre y médula ósea. Las pruebas de sensibilidad están disponibles para tres fármacos: isoniacida, rifampicina y etambutol.

7.3.2.3. Sistema MB/BacT ALERT 3D. Sistema automatizado de cultivo colorimétrico que detecta la producción de CO_2 como indicador de crecimiento bacteriano. El medio utilizado es el básico 7H9 de Middlebrook suplementado con factores de crecimiento y una solución antibiótica para las muestras de origen no estéril. Con una monitorización continua, los cultivos permanecen en el incubador-lector sin un manejo adicional hasta que el equipo notifica su positividad o bien su negatividad tras el periodo de incubación fijado. La capacidad de cultivo es variable y muy versátil ya que permite la adición de múltiples armarios incubadores de 240 cultivos cada uno. Otra ventaja es que puede utilizarse, al igual que el ESP Culture System II, con todo tipo de muestras, incluidas las sanguíneas. A diferencia de este sólo admite el método de descontaminación de la NaOH-NALC (N-acetil-L-cisteína). Recientemente se han empezado a realizar las pruebas de sensibilidad en *M. tuberculosis* a los antimicobacterianos de primera línea, sin incluir la pirazinamida. La aplicación de estas pruebas en la rutina de los laboratorios clínicos se encuentra en evaluación.

7.3.2.4. Sistema BACTEC MGIT 960. Es el último sistema automatizado que ha aparecido en el mercado. Este sistema utiliza el medio MGIT, detectando consumo de O_2 mediante unos sensores fluorométricos. Un aspecto relevante de este medio (MGIT) es que los tubos poseen tapones de rosca, evitando el uso de agujas y jeringuillas. Los resultados se proporcionan como positivo o negativo y en unidades de crecimiento. Básicamente, es un sistema de gran capacidad (960 cultivos) diseñado para laboratorios con un gran volumen de muestras (8.000 por año aprox.). Este método no puede utilizarse en muestras hemáticas y, al igual que el MB/BacT ALERT 3D, sólo admite el método de descontaminación de NaOH-NALC (N-acetil-L-cisteína). Recientemente, se ha introducido para la realización de las pruebas de sensibilidad de *M. tuberculosis* a los antimicobacterianos de primera línea, incluida la pirazinamida. Aunque ha sido aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) y los datos iniciales son muy prometedores, la utilización sistemática de estas pruebas en los laboratorios de Microbiología está en proceso de consolidación y consenso general.

7.3.2.5. Sistema BACTEC serie 9000. Se trata de un sistema automatizado de hemocultivos convencionales que, mediante un *software* y un medio de cultivo específico, puede utilizarse para la recuperación de micobacterias en muestras hemáticas. Es un sistema colorimétrico con una capacidad de 50 a 240 cultivos que complementaría el MGIT 960.

7.4. CONDICIONES DE INCUBACIÓN.

La mayoría de las especies tienen un buen crecimiento a 35-37°C. No obstante, en algunas muestras clínicas (piel y tejidos blandos) donde pueden intervenir especies (*M. marinum*, *M. chelonae*, *M. haemophilum*, *M. ulcerans*, etc.) cuya temperatura de incubación óptima es menor, se deberán sembrar e incubar un grupo adicional de cultivos entre 25 y 33°C. En la actualidad, ello es factible en los cultivos de lectura manual.

Un aspecto importante para mejorar el crecimiento en los medios sólidos es la incubación con un 5-10% de CO₂ que, en el caso del Löwenstein-Jensen, puede reducirse a los primeros 7-10 días tras la siembra, incubando después en una estufa convencional.

Como regla general, el tiempo de incubación debe ser prolongado. Aunque no hay un acuerdo unánime, el periodo de 6-8 semanas parece ser el más adecuado. Ante la sospecha de una micobacteria de crecimiento muy lento, muestras sanguíneas o aquellas con una baciloscopia o amplificación genética positiva, se podría alargar la incubación 4 semanas más.

La lectura de los cultivos manuales se adaptará a las necesidades y posibilidades de cada laboratorio. Una recomendación general sería una lectura a los 3-5 días de la siembra y posteriormente, 2 veces a la semana durante las 4 primeras semanas, seguida de una lectura semanal hasta el final de la incubación.

8. IDENTIFICACIÓN

8.1. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

A lo largo de los últimos años, el número de especies nuevas de micobacterias ha aumentado de forma muy importante, principalmente gracias al desarrollo de las técnicas basadas en la biología molecular. Sin embargo, y a pesar de la creciente implantación de estas técnicas en los laboratorios asistenciales, gran parte de ellos continúan usando, en mayor o menor medida, diversas características fenotípicas para la caracterización de los aislamientos.

8.1.1. Microscopía. Como se ha comentado, una característica común de todo el género *Mycobacterium* es su ácido-alcohol resistencia. Este hecho es importante para confirmar que el crecimiento observado en el cultivo es una micobacteria y detectar una posible contaminación. Aunque otros organismos pueden exhibir dicha ácido-alcohol resistencia, esta es parcial a diferencia de las micobacterias que son capaces de resistir una decoloración fuerte. Además, como se ha descrito con anterioridad (sección 5), dentro del género existen diferencias microscópicas que pueden orientar de forma presuntiva la identificación de alguna especie.

8.1.2. Velocidad de crecimiento. Ello nos permite hacer una primera división de las micobacterias en dos grandes grupos: micobacterias de crecimiento lento y de crecimiento rápido. Esto se basa en los días de incubación que un subcultivo sólido (ej., 7H10 de Middlebrook) necesita para la detección de colonias

visibles macroscópicamente. Un punto crítico es la dilución del inóculo utilizada en dicho subcultivo. Las micobacterias que tardan más o menos de 7 días serán catalogadas como lentas o rápidas, respectivamente. Sin embargo, existen algunas especies cuya velocidad de crecimiento se encuentra en un grupo intermedio que, en algún caso, puede ser modificable en función de otras variables, como la temperatura de incubación (ej., *M. marinum*). Dicha clasificación es muy importante, puesto que los planteamientos diagnósticos van a cambiar dependiendo de que el aislamiento pertenezca a un grupo u otro.

8.1.3. Temperatura de crecimiento. Es una característica que permite tanto la recuperación de determinadas especies como su identificación presuntiva. En general la temperatura óptima de crecimiento suele ser de 37°C. No obstante, existen especies que precisan temperaturas más bajas (30°C), en especial las aisladas en piel y tejidos blandos (*M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*). Otras, en cambio, requieren temperaturas más elevadas de 42°C (*M. xenopi*) o incluso 52°C (*M. thermoresistibile*) para obtener una tasa de crecimiento mejor.

8.1.4. Características de las colonias

8.1.4.1. Producción de pigmento. Se basa en la capacidad de producir pigmentos carotenoides en relación con la exposición a la luz: fotocromógenas si la producción depende de la luz o escotocromógenas si es independiente de la misma. Además estarían las especies que no producen pigmentos o micobacterias no cromógenas. Este aspecto permitió clasificar las micobacterias en los ya clásicos grupos de Runyon (tabla 1).

8.1.4.2. Morfología de las colonias. Tanto en medios con base de huevo o de agar. En manos expertas, todas estas características permiten al microbiólogo orientar hacia la identificación de la especie con un elevado grado de fiabilidad, especialmente si se tiene en cuenta que, las micobacterias de interés clínico más frecuentes son un grupo reducido dentro del total de especies del género. Así, la aparición de colonias rugosas no pigmentadas de crecimiento lento y aspecto de migas de pan suele ser característica de *M. tuberculosis*, mientras que las colonias pequeñas, lisas y no pigmentadas son características del complejo *M. avium*. En cambio las colonias grandes, lisas, mucosas, de crecimiento lento pero fotocromógenas serían más típicas de *M. kansasii*. Una aproximación distinta es la que estudia las **características microscópicas** de las colonias en medios con agar, donde se pueden observar las estructuras características de las cuerdas o cordones (propias de *M. tuberculosis*) incluso antes de que puedan detectarse colonias visibles macroscópicamente.

8.1.5. Pruebas bioquímicas. El número de estas pruebas ha llegado a ser amplísimo, lo que ha dado lugar a no pocos problemas de interpretación de las

mismas. En 1992 se propusieron unos requisitos mínimos para la definición de especies de **micobacterias de crecimiento lento**. Entre estos requisitos se encuentra un número limitado de pruebas bioquímicas que, junto con pruebas genéticas y moleculares, permitirían la caracterización de las distintas especies de este grupo de micobacterias. Estas pruebas son: la catalasa semicuantitativa y termotolerancia de la misma, hidrólisis del Tween 80, ureasa, producción de niacina, reducción de nitratos, actividad fosfatasa ácida, actividad arilsulfatasa, actividad pirazinamidasa, actividad α -esterasa, resistencia a la isoniácida, T-2-CH, hidroxilamina, ácido *p*-nitrobenzoico, NaCl, tiacetazona, picrato y oleato, así como la capacidad de crecer a diversas temperaturas (tabla 5). Sin embargo, la descripción de nuevas especies cuyos perfiles fenotípicos se solapan con otras ya conocidas ha limitado notablemente la utilidad de estos esquemas como único medio de identificación de los aislamientos. Otros aspectos negativos de estas técnicas son la necesidad de un gran inóculo (cultivos muy crecidos) y la lentitud en la obtención de resultados, especialmente los negativos. Sin embargo la realización de pruebas bioquímicas no es un hecho obsoleto en el laboratorio de micobacteriología. De hecho, algunos esquemas más comúnmente basados en la biología molecular, como es el caso de las sondas comerciales o de amplificación genética, identifican algunas especies sólo a nivel de grupo o complejo, como es el caso del complejo *M. tuberculosis*. La aplicación de algunas pruebas bioquímicas relativamente sencillas permitiría, en este caso, conseguir la identificación de especie. Además, otras ventajas de las pruebas bioquímicas son la sencillez, economía y el no requerir un gran equipamiento.

En el caso de las **micobacterias de crecimiento rápido**, la variabilidad de los resultados dentro de una misma especie (o la falta de la misma entre distintas especies) hace inútiles muchas de estas pruebas para su caracterización fenotípica. Recientemente se ha propuesto un esquema de identificación fenotípica para las especies no pigmentadas de crecimiento rápido basado fundamentalmente en la capacidad de crecer en medios con determinados azúcares como única fuente de carbono (tabla 6). Sin embargo, este esquema no es válido para el amplio grupo de MNT de crecimiento rápido pigmentadas (sin implicaciones clínicas en patología humana, salvo casos anecdóticos), ya que la variabilidad de los resultados hace virtualmente imposible una caracterización fenotípica correcta, debiendo recurrirse a técnicas moleculares.

La identificación de las micobacterias mediante pruebas bioquímicas exige experiencia y el conocimiento de su fundamento. Además, debe tenerse en cuenta que la identificación no puede descansar sólo en una prueba, por muy específica que

parezca (caso de la niacina y *M. tuberculosis*), sino en los resultados coherentes de un conjunto de ellas.

8.1.5.1 Prueba de la niacina. Todas las micobacterias producen ácido nicotínico durante su crecimiento. *M. tuberculosis* y algunos aislados de *M. africanum*, *M. simiae* y *M. chelonae* no metabolizan el ácido nicotínico y por ello lo acumulan. La niacina es excretada al medio, sobre todo en medios con base de huevo, del cual puede ser extraída y detectada. Las tiras de papel comerciales están impregnadas con cloramina y tiocianato potásico acidificado, y liberan cloruro de cianógeno, el cual reacciona con PAS (ácido para-amino-salicílico) y produce un color amarillo en presencia de niacina. Si no está ésta, no se produce color.

Una prueba de niacina positiva en un cultivo de micobacterias lentas no cromogénicas con colonias rugosas (en miga de pan) y de crecimiento lento, aislado en una muestra clínica es prácticamente diagnóstico de *M. tuberculosis*. La intensidad de la reacción depende de la cantidad de crecimiento en el cultivo presente.

8.1.5.2. Reducción de los nitratos. Las micobacterias difieren en su capacidad para reducir los nitratos a nitritos mediante la presencia de nitrato reductasa. Es muy útil para diferenciar las especies de micobacterias de crecimiento rápido, así como algunas de crecimiento lento (*M. kansasii*, *M. tuberculosis*, etc.). La prueba se basa en la capacidad de las aminas aromáticas para formar cloruro de dizalcoonio en presencia de nitrito sódico y ácido clorhídrico. El cloruro de dizalcoonio puede unirse al diclorhidrato de *N*-(1-naftil) etilendiamina para formar un derivado azoico que inicia la reacción.

8.1.5.3. Prueba de la catalasa. La catalasa rompe el H_2O_2 en agua y oxígeno libre que aparece como burbujas. Todas las micobacterias, excepto algunos aislados de *M. tuberculosis* y de *M. bovis* resistentes a la isoniácida producen catalasa, sin embargo, las micobacterias varían en la cantidad de catalasa producida (principio de la catalasa semicuantitativa) y en la termoestabilidad de la enzima (la capacidad de ésta para seguir actuando tras ser sometida a altas temperaturas, principio de la catalasa a 68°C).

8.1.5.4. Prueba de la arilsulfatasa. La arilsulfatasa es una enzima capaz de hidrolizar el enlace entre sulfato y el anillo aromático en un compuesto tal como el disulfato potásico de fenolftaleína. La fenolftaleína libre puede entonces ser reconocida mediante la formación de color rojo cuando se añade un álcali. La mayoría de las micobacterias poseen este enzima, pero las condiciones de la prueba permiten distinguir entre diferentes especies. Es una prueba muy útil en la identificación de micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido

Tabla 5. Identificación fenotípica de las micobacterias de crecimiento lento más frecuentes

Especie	NIA	NIT	AS	Tw80	URE	NaCl	C-SQ	C-68°	INH 1	INH 10	HIDRO	P-NB	OLE	PZA	22°C	30°C	37°C	42°C	PIGMENTO
<i>M. avium</i>	-	-	-	-	-	-	-	V	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	NO
<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	NO
<i>M. ulcerans</i>	-	-	-	-	V	-	-	-	+	V	+	V	-	-	+	+	V	-	NO
<i>M. genavense</i>	-	-	-	-	+	ND	+	+	+	ND	ND	ND	ND	+	-	+	+	+	NO
<i>M. bovis</i>	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	+	-	NO
<i>M. nonchromogenicum</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	V	V	+	+	+	+	V	NO
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	+	+	-	NO
<i>M. haemophilum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	-	+	ND	+	+	+	-	-	NO
<i>M. celatum</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	ND	ND	-	+	+	+	NO
<i>M. terrae</i>	-	V	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	V	-	+	+	+	-	NO
<i>M. triplex</i>	-	+	-	-	+	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	-	NO
<i>M. triviale</i>	-	+	-	V	-	+	+	+	+	+	ND	+	ND	-	+	+	+	-	NO
<i>M. africanum</i>	V	V	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	V	+	V	NO
<i>M. microtii</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	ND	+	-	NO
<i>M. malmoense</i>	-	-	-	+	V	-	-	V	+	-	V	+	-	+	+	+	+	-	NO
<i>M. kansasii</i>	-	+	V	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	FOTO
<i>M. marinum</i>	-	-	V	+	+	-	V	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	+	+	V	-	FOTO
<i>M. asiaticum</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	+	-	+	-	+	+	+	-	FOTO
<i>M. simiae</i>	v	-	-	-	+	-	+	+	+	V	+	+	V	+	+	+	+	+	FOTO
<i>M. lentiflavum</i>	-	-	-	-	-	ND	V	V	+	ND	+	+	V	V	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. scrofulaceum</i>	-	V	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	ESCOTO
<i>M. gordonae</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	V	V	+	V	-	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. xenopi</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	V	-	+	-	V	+	+	ESCOTO
<i>M. szulgai</i>	-	+	-	V	+	-	+	+	-	ND	-	+	+	+	+	+	+	-	ESCOTO

NIA: Niacina; NIT: Nitratos; AS: Arilsulfatasa (3 días); Tw80: Tween 80; URE: Ureasa; NaCl: NaCl 5%; C-SQ: Catalasa semicuantitativa; C-68°: Catalasa termoestable (68°C); INH 1: Isoniacida 1 µg/ml; INH 10: Isoniacida 10 µg/ml; HIDRO: Hidroxilamina; P-NB: ácido p-nitrobenzoato; OLE: Oleato; PZA: Pirazinamidasa; 22°C, 30°C, 37°C, 42°C: Temperaturas de incubación; +: Positivo; -: Negativo; V: Variable; ND: no determinado; FOTO: Fotocromógeno; ESCOTO: Escotocromógeno; NO: No cromógeno.

Tabla 6. Identificación fenotípica de las micobacterias de crecimiento rápido más frecuentes.

	AS	CINa	McC	Captación de hierro	Manitol	Inositol	Sorbitol	Citrato	Nitratos	30°C	37°C	42°	Pigmento
<i>M. thermoresistibile</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	ESCOTO
<i>M. aurum</i>	V	V	-	+	+	+	-	+	V	+	+	-	ESCOTO
<i>M. neoaurum</i>	-	ND	-	ND	+	+	ND	+	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. gadium</i>	-	ND	ND	-	ND	+	+	-	+	+	+	-	ESCOTO
<i>M. flavescens</i>	-	+	-	-	V	-	+	-	+	+	+	V	ESCOTO
<i>M. novocastrense</i>	-	+	+	-	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	FOTO
<i>M. alvei</i>	+	-	-	-	-	-	ND	-	+	+	+	-	NO
<i>M. brumae</i>	-	-	-	+	-	+	ND	+	+	+	+	-	NO
<i>M. elephantis</i>	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	+	+	+	NO
<i>M. porcinum</i>	+	+	ND	ND	+	+	-	-	+	+	+	-	NO
<i>M. peregrinum</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	NO
<i>M. fortuitum</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	NO
<i>M. boenickei</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	NO
<i>M. houstonense</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	NO
<i>M. neworleansense</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	NO
<i>M. brisbanense</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+		NO
<i>M. mucogenicum</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	V	+	+	-	NO
<i>M. mageritense</i>	+	+	+	V	+	V	ND	V	V	+	+	+	NO
<i>M. canariasense</i>	+	-	+	-	+	+	ND	-	-	+	+	-	NO
<i>M. abscessus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	NO
<i>M. chelonae</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	NO
<i>M. immunogenum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	NO
<i>M. septicum</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	NO
<i>M. smegmatis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NO
<i>M. wolinskyi</i>	-	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	NO
<i>M. goodii</i>	-	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	NO/ESCOTO

AS: Arilsulfatasa (3 días); CINa: crecimiento en 5% de CINa; McC: crecimiento en agar de McConkey sin cristal violeta; 30°C, 37°C y 42°C: temperaturas de incubación; +: Positivo; -: Negativo; V: Variable; ND: No determinado; ESCOTO: Escotocromógeno; FOTO: Fotocromógeno; NO: No cromógeno.

8.1.5.5. Hidrólisis del Tween 80. La capacidad de hidrolizar el Tween 80, liberando ácido oleico esterificado contenido en el mismo, permite distinguir entre diversas especies. Cuando se une al Tween 80, el rojo neutro se colorea de ámbar. La hidrólisis del Tween 80 libera el rojo neutro que vuelve a su color rojo original. Es útil en la caracterización de micobacterias de crecimiento lento.

8.1.5.6. Reducción del telurito. La mayoría de las micobacterias pueden reducir el telurito potásico a telurio metálico, visible en los cultivos líquidos mediante un precipitado negro. Sin embargo, varía la velocidad con la que se produce. La mayoría de los aislamientos del complejo *M. avium* y de micobacterias de crecimiento rápido son capaces de reducir el telurito en 3 días, mientras que otras necesitan más tiempo. Esta prueba se utiliza para la identificación de los microorganismos del complejo *M. avium*.

8.1.5.7. Tolerancia al cloruro de sodio. Algunas micobacterias son capaces de crecer en un medio con una concentración del 5% de NaCl, característica que puede ser útil para diferenciarlas de otras especies que no crecen en tales concentraciones.

8.1.5.8. Prueba de la pirazinamidasasa. La capacidad de producir pirazinamidasasa confiere a la micobacteria la característica de ser resistente a la pirazinamida. Esta técnica fue desarrollada inicialmente para identificar *M. bovis* (resistencia natural a la pirazinamida). Sin embargo, la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a este fármaco limita su utilidad, aunque puede ser útil en la identificación de otras especies.

8.1.5.9. Incorporación o captación del hierro. Se basa en la capacidad de algunas especies de micobacterias (fundamentalmente de crecimiento rápido) de captar el citrato férrico amoniacal y reducirlo a óxido de hierro, adquiriendo un color marrón.

8.1.5.10. Crecimiento en agar de McConkey sin cristal violeta. El crecimiento en McConkey sin cristal violeta permite diferenciar entre distintas especies de crecimiento rápido, en particular dentro de las no pigmentadas, fundamentalmente entre las que se asocian y no se asocian con patología humana (salvo casos mucho menos frecuentes). La mayoría de las especies de micobacterias no son capaces de crecer en este medio.

8.1.5.11. Sensibilidad al T-2-CH (hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico). Esta prueba se basa en la capacidad de algunas especies de micobacterias para crecer en presencia de TCH. Aunque inicialmente se utilizó para diferenciar entre *M. tuberculosis* (positivo) y *M. bovis* (negativo), se vio posteriormente que algunas cepas de *M. africanum* tampoco crecían en presencia de dicho compuesto. Sin embargo, es una prueba útil para diferenciar *M. tuberculosis* de otras especies del complejo tuberculosis. Hay que tener en cuenta, además, que la resistencia a la isoniácida implica la resistencia al TCH, por lo que en cepas de *M. bovis* o *M. africanum* resistentes a la isoniácida no es una prueba valorable.

8.1.5.12. Tolerancia a isoniácida, hidroxilamina, p-nitrobenzoato y oleato. El principio de todas estas pruebas es el mismo. Consiste en estudiar la capacidad de las distintas especies de micobacterias para crecer en medios que incorporen en su composición determinadas sustancias inhibitoras. Es un grupo de pruebas aplicado fundamentalmente a la identificación de micobacterias de crecimiento lento.

8.1.5.13. Crecimiento en distintos sustratos. Este conjunto de pruebas se basa en la utilización por las micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido de diversas sustancias como única fuente de carbono o de nitrógeno. En la actualidad, es una técnica fundamental para la identificación de estas especies.

8.1.6. Técnicas comerciales. La posibilidad de caracterizar las micobacterias más frecuentes mediante pruebas bioquímicas ha llevado a explorar las posibilidades de diversos sistemas comerciales de caracterización bacteriana, como el sistema API[®], si bien los resultados no han sido lo suficientemente buenos como para sustituir a las pruebas clásicas. Es de destacar que las micobacterias de crecimiento rápido pueden crecer en algunos casos en los medios convencionales de cultivo, lo que puede llevar a una caracterización errónea de las mismas como diferomorfos u otros bacilos grampositivos, especialmente si se emplean los sistemas comerciales de identificación de éstos (ej., API-CORYNE[®]), ya que pueden aparecer códigos de identificación coherentes con otros organismos. La simple realización de una tinción ácido-alcohol resistente permitiría deshacer el equívoco en los casos en los que el aislamiento pudiera considerarse como potencialmente significativo.

8.2. IDENTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA

El análisis cualitativo de la composición lipídica de la pared de las micobacterias permite diferenciar especies o grupos de especies. Existen tres tipos de técnicas cromatográficas utilizadas en la identificación: cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases (GLC) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En todas ellas se obtiene la muestra adecuada a partir de la cepa, después de una extracción y separación de los lípidos del resto de componentes celulares y de un tratamiento que posibilite su migración o volatilidad. En general son técnicas que permiten la identificación de especie, con sus limitaciones, en un periodo razonablemente rápido (1-2 días).

8.2.1. Cromatografía en capa fina (TLC). Es la de menor poder de discriminación, y por tanto, escasamente utilizada. Los extractos de las muestras se depositan en placas de cristal o de aluminio, que actúan de soporte de una capa de gel de sílice y se someten a un proceso de difusión utilizando uno o dos eluyentes. Posteriormente se revelan evidenciando de 1 a 3 manchas cromatográficas que definen patrones de migración de seis tipos de ácidos micólicos (I-VI).

El principal inconveniente es que es una técnica con baja discriminación, sobre todo para las especies de crecimiento lento. Así, especies como *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* y *M. tuberculosis* comparten el mismo patrón. Su principal ventaja es la fácil estandarización y la necesidad de una infraestructura mínima.

8.2.2. Cromatografía de gases (GLC). Su poder de resolución es mayor. Permite la detección cualitativa de metil-ésteres de ácidos grasos de los ácidos micólicos. Consiste en la inyección de la muestra previamente tratada en un cromatógrafo equipado con una columna capilar o semicapilar. La muestra, volatilizada por efecto de la temperatura de inyección, viaja con un gas transportador través de la columna, que a su vez no es inerte, sino que consta de un relleno interior, la fase estacionaria, capaz de interactuar con diversos componentes de la muestra, de forma que sustancias que no interesen pueden quedar retenidas en la columna. En la identificación de micobacterias, los ácidos grasos son los productos a analizar. En la columna se separan según la longitud de su cadena, siendo al final expulsados en orden de menor a mayor tamaño. Un sistema de detección permite establecer el tiempo de retención que cada ácido graso ha tenido en el interior de la columna. Los resultados se registran en forma de una línea continua interrumpida por picos, de mayor o menor amplitud o altura dependiendo de su concentración y rapidez de salida, indicando cada uno a un ácido graso. Todos los picos de una muestra constituyen su cromatograma. Atendiendo a su composición y tamaño los productos que se pueden detectar son de tres tipos: ácidos grasos saturados o insaturados con cadena de 12 a 20 carbonos, ácidos grasos de mayor longitud, 22 a 26 carbonos, y alcoholes secundarios de éstos. La identificación de los ácidos grasos se efectúa por comparación de sus tiempos de retención individuales con patrones conocidos. La clasificación de especie se obtiene analizando el patrón cualitativo de los componentes de cada muestra. Aproximadamente una docena de especies, incluyendo a la mayoría de las más frecuentes en clínica, tienen un patrón específico propio (*M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. chelonae*, *M. agri*, *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. gordonae*, *M. simiae*) o característico compartido por más de una especie (*M. intracellulare*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*). El resto de especies, entre ellas las del complejo *M. tuberculosis*, muestran patrones inespecíficos que únicamente tienen valor de exclusión. Esta inespecificidad es más patente en las micobacterias de crecimiento rápido.

Se trata de una técnica muy útil en la identificación de los aislamientos clínicos pero compleja en su estandarización. Precisa de un equipo costoso en su adquisición y de uso complejo, que obliga a estandarizar el método en cada centro. Las condiciones de funcionamiento del cromatógrafo (temperaturas de inyección, de columna, de detección) y el tipo de

columna utilizado, condicionan en gran medida el resultado. Estas dificultades impidieron su difusión generalizada en un momento en que se ofrecía como una buena alternativa en la identificación, sobre todo si se combinaba con la cromatografía en capa fina y las características de crecimiento y pigmentación de las cepas. Las actuales técnicas de detección genética la relegan a centros de referencia o en aquellos en los que ya esté estandarizada.

8.2.3 Cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Guarda muchas similitudes con la cromatografía de gases (GLC), con algunas diferencias técnicas y una mayor rentabilidad diagnóstica, por lo que su difusión es mayor, sobre todo en América del Norte y Europa. El proceso de extracción de los ácidos grasos de la muestra varía, presentándose éstos como ésteres de bromofenacil, capaces de adsorber luz U.V. A través de una fase móvil líquida (metanol y diclorometano) las muestras son transportadas a lo largo de la columna, produciéndose la separación de los ácidos grasos. Éstos son detectados al final por un espectrofotómetro U.V. Al igual que en la cromatografía de gases (GLC), los ácidos grasos aparecen en el registro en forma de picos de amplitud y altura variable. Se han descrito hasta 37 picos distintos. Cada uno de ellos representa a uno o más ácidos grasos. El patrón cromatográfico de cada muestra constituye el elemento identificador, es decir, la combinación de los picos observados.

La interpretación de los resultados se realiza por inspección visual del cromatograma obtenido y comparación con patrones conocidos. En los últimos años se están desarrollando programas informáticos para identificar los cromatogramas obtenidos. Diversos estudios han corroborado su utilidad, con una especificidad del 70 al 95% según las especies. Su inconveniente principal son las posibles variaciones interespecie y las similitudes entre algunas especies. Ello obliga a mantener estos programas permanentemente actualizados e introducir las variantes de especies. Actualmente la actitud más recomendada es utilizarlos junto con la inspección visual.

La existencia de un mayor número de picos posibles respecto a la GLC, le confiere una mayor potencialidad diagnóstica. Existen patrones de referencia validados en estudios multicéntricos, válidos para la identificación de al menos 23 especies entre las más frecuentes en clínica, aunque en la literatura se han comunicado patrones específicos de más de 40 especies.

Los inconvenientes de esta técnica son prácticamente superponibles a los de la GCL: equipo costoso, necesidad de estandarización en cada centro, precisa aprendizaje y se requiere tener un patrón propio de referencia.

8.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

En la actualidad, la identificación genotípica parece ser la mejor alternativa para una precisa y rápida identificación de las especies micobacterianas. Sus

principales ventajas consisten en una aplicación universal sobre todos los aislamientos, posible detección rápida (directo de muestras o cultivos recientes), identificación de microorganismos de difícil cultivo, reconocimiento preliminar de nuevos taxones micobacterianos, gran seguridad biológica y una adecuada relación coste-beneficio en los laboratorios clínicos de nivel III o de referencia. Por contra, aparte de las contaminaciones potenciales y limitaciones en su empleo directo sobre muestras clínicas, estas técnicas no pueden hoy día sustituir completamente a la metodología tradicional. Por otro lado, apenas existe comercialización de las mismas y algunas, como la secuenciación, requieren una inversión inicial elevada. Sin embargo, en la actualidad existe una gran variedad de técnicas y con diferentes niveles de aplicación. Por ello, algunas de ellas pueden ser perfectamente instauradas en los laboratorios de rutina sin precisar un elevado dispendio inicial, con un escaso mantenimiento y un rendimiento óptimo.

8.3.1. Sondas de ácidos nucleicos. En la última década han aparecido sondas comerciales de ADN (AccuProbe) no radiactivas que permiten identificar por hibridación con el ARN ribosómico micobacteriano, de forma rápida (2 horas) y específica, el complejo *M. tuberculosis*, el grupo *M. avium-intracellulare*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. goodii*. Estas sondas se pueden aplicar a partir de medios sólidos y líquidos. Asimismo, ofrecen la posibilidad de utilización en medios líquidos con contenido hemático siendo necesario una pequeña preparación previa mediante concentración y lavados con dodecil sulfato sódico y EDTA.

Las sondas han sufrido a lo largo de los años diferentes reformulaciones debido a diversos problemas de sensibilidad y especificidad. Pero en la actualidad, en combinación con los nuevos sistemas de cultivo automatizados, constituyen uno de los modelos de referencia en la detección e identificación micobacteriana clínica rutinaria. Sin embargo, su aplicación queda limitada a un grupo reducido, aunque importante, de microorganismos. Además, requiere una orientación presuntiva para la elección de la sonda correspondiente, al poder tan sólo realizar una identificación por prueba. Esta selección puede realizarse de una forma sencilla y bastante sensible, mediante tinción de Ziehl-Neelsen directa del cultivo. También es importante no olvidar la frecuencia de cultivos micobacterianos mixtos en pacientes inmunodeprimidos. Ello obliga a realizar un subcultivo, a pesar de una identificación positiva con la sonda de ADN para el grupo *M. avium-intracellulare* o *M. tuberculosis*, principalmente.

8.3.2. Amplificación de secuencias específicas de DNA. Este grupo de técnicas requiere la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otro sistema, de una zona de ADN concreta (diana) y la observación directa de los fragmentos obtenidos o un posterior análisis postamplificación

mediante restricción, hibridación o secuenciación. En las micobacterias existen regiones bien conservadas de ADN específicas de género, que flanquean regiones hipervariables específicas de especie. En la actualidad las dianas mejor estudiadas son el gen *hsp65* que codifica la proteína micobacteriana de 65 KDa (*heat shock*) y regiones de la subunidad ribosómica 16S. No obstante, existen otras zonas útiles como son, entre otras, la región intergenética 16S-23S ribosomal y los elementos de inserción.

a. Preparación de la muestra. Aunque existe la interesante posibilidad de extraer el ADN directamente de la muestra clínica, estas técnicas han probado funcionar mejor a partir de cultivo (sólido o líquido). Por ello, la cantidad de ADN disponible es elevada y fácil de obtener, no requiriendo una extracción cuidadosa y laboriosa como en el caso del fenol-cloroformo. Tan solo una lisis en sus diferentes variedades es suficiente, pudiéndose incorporar en cualquier laboratorio de rutina. Los métodos más sencillos y prácticos consistirían en hervir una suspensión de colonia micobacteriana, durante 20 minutos o bien llevar a cabo una disrupción mecánica mediante ultrasonidos (sonicación).

b. Amplificación. Actualmente no constituye problema alguno. Un gran número de laboratorios clínicos poseen una mínima infraestructura para la realización de PCR u otros métodos con diversas finalidades, y se encuentran familiarizados con este tipo de técnicas. Las nuevas generaciones de termocicladores que utilizan tubos de reacción de pared fina, consiguen amplificar en menos de 2 horas. Además, al realizar la PCR a partir de cultivos, existe una gran cantidad de ADN diana que impide en gran manera la contaminación potencial por los amplicones, a diferencia de la amplificación genómica diagnóstica directa de muestra con un bajo número de microorganismos.

c. Análisis postamplificación. Existen diversas posibilidades. Las más importantes son:

- **PCR-RFLP (*hsp65*).** Esta técnica basada en la amplificación (PCR) del gen *hsp65* y posterior análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP), mediante dos enzimas de restricción (*BstEII* y *HaeIII*), consigue una identificación rápida, precisa y económica de todos los aislados micobacterianos en los laboratorios clínicos. Aunque existen otras técnicas similares (ej., PCR-RFLP del 16S-23S), ésta es actualmente la mejor desarrollada con una aplicación práctica de indudable valor, obteniendo el resultado final en la misma jornada laboral. Existe una experiencia acumulada en diversos centros, donde poseen una amplia relación de los polimorfismos encontrados y los aislamientos correspondientes que se encuentra reflejada en una página web (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>) donde se pueden llevar a cabo y consultar las identificaciones, así como el intercambio con diversos expertos en dicho método. Gracias a todo ello, se conoce que la técnica es lo suficientemente discriminativa para diferenciar las

especies y subespecies de los diversos complejos micobacterianos, e incluso dentro de las especies consideradas clásicamente homogéneas y en las que recientemente se ha descrito su heterogeneidad, como en *M. kansasii*.

• **Secuenciación (ADN) de la subunidad ribosomal 16S.** La secuenciación automática con iniciadores marcados con fluoresceína representa un avance sustancial y soluciona la identificación de muchas bacterias que por métodos convencionales es imposible. Esta técnica, patrón de referencia de la identificación genotípica, tiene diversas bases de datos disponibles: GenBank/Entrez (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) y Ridom 16S rDNA (<http://www.ridom.de/rdna/>). Aunque existen diversos trabajos que propugnan su aplicación en rutina, sigue siendo un método caro y laborioso, que queda limitado a laboratorios de referencia. No obstante, los avances tecnológicos son constantes y la mayor automatización con los nuevos secuenciadores capilares o la aparición de microchips de secuenciación del ADN podrían suponer una alternativa potencial en el futuro.

• **Hibridación en fase sólida.** Utiliza una tecnología prometedora en pleno desarrollo basada en sondas cortas de ADN específicas de especie y presentadas en formatos más o menos convencionales (placas con micropocillos, tiras de nitrocelulosa, etc) y otros de futura aplicación como son los microchips (APEX, Nanogen, Inc./Becton Dickinson Microbiology Systems). En una sola prueba, se aplicaría el producto de amplificación sobre diversas sondas de los microorganismos más frecuentemente aislados y con importancia clínica. En la actualidad se dispone de dos productos comerciales: INNO-LiPA MYCOBACTERIA y GenoType Mykobacterien. Ambos métodos identifican *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. celatum* y *M. malmoense*. A ellos se añade el nuevo INNO-LiPA que incluye *M. simiae*, *M. marinum/ulcerans*, *M. haemophilum* y *M. smegmatis*. Mientras que el GenoType incluye *M. peregrinum* y *M. phlei*. Ambos sistemas se basan en la amplificación de una zona genética concreta (espacio intergenético 16S-23S para el INNO-LiPA y el 23S rADN para el GenoType). Posteriormente se realiza la hibridación del producto de amplificación sobre las diferentes sondas dispuestas en una tira de nitrocelulosa, que son de fácil lectura e interpretación. En los pocos estudios realizados se ha observado que ambos sistemas son muy similares, con una buena sensibilidad y especificidad a partir de cultivos líquidos y sólidos, obteniéndose los resultados en 5-6 h. Además de la variedad de especies que pueden identificarse en una sola prueba, otra ventaja de estos métodos es la detección de posibles coinfecciones por diversas especies en una misma muestra. Los principales inconvenientes son la laboriosidad y coste de ambos, aunque inicialmente el GenoType es algo más económico.

• **Amplificación y detección a tiempo real.** Más recientemente se ha comenzado a utilizar, con fines diagnósticos, la tecnología de amplificación y detección a tiempo real. Estos métodos se basan en la realización simultánea de una amplificación de una zona diana concreta y reconocimiento de la misma mediante hibridación. Esta última se detecta y se mide (cuantifica), mediante el uso de diversos marcadores fluorogénicos. Las mayores ventajas residen en su rapidez (3 h) y las posibilidades futuras de aplicación para un amplio abanico de especies, así como la detección directa de muestra. En la actualidad existen diversos sistemas de amplificación y marcaje, aunque tan sólo uno está comercializado: BDProbeTec ET. Este se basa en la amplificación por desplazamiento de cadenas de ADN (SDA: *Strand Displacement Amplification*) y detección mediante transferencia de energía fluorescente (ET). A partir de cultivo, incluye la identificación de *M. tuberculosis* complex, *M. kansasii* y *M. avium* complex. Existe, además, la posibilidad de identificar *M. tuberculosis* complex directamente de muestras respiratorias. En general, tanto el BDProbeTec ET, como los métodos no comercializados que utilizan los sistemas LightCycler o ABI 7700 (TaqMan), se encuentran en desarrollo y con los que existe una experiencia escasa. No obstante, los primeros datos son prometedores y constituyen una alternativa real de futuro en la identificación micobacteriana de rutina.

9. DETECCIÓN DIRECTA DE *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra clínica

Durante la última década se han desarrollado diferentes métodos moleculares, especialmente de amplificación genómica, para la detección e identificación del complejo *M. tuberculosis* directamente en muestras clínicas. A pesar de los buenos resultados obtenidos en muestras respiratorias con baciloscopia positiva y del consenso existente para su utilización en las mismas, continúa la controversia acerca de cuál es la utilidad real en muestras con baciloscopia negativa (aprobado por la FDA) y en muestras no respiratorias. Por todo ello, el diagnóstico directo con técnicas de amplificación de ácidos nucleicos debe considerarse, en la actualidad, como un complemento de la metodología diagnóstica convencional (baciloscopia y cultivo) y los resultados obtenidos deben interpretarse en el contexto clínico de los pacientes, además de valorar su coste-eficacia debido al impacto económico que ello conlleva.

En virtud de las diferentes dianas, métodos de amplificación y detección utilizados existen en la actualidad múltiples sistemas comerciales y caseros. En general, para el diagnóstico de la tuberculosis se recomienda recurrir a los sistemas comerciales, algunos de los cuales cuentan con la aprobación de diferentes organismos internacionales.

9.1. SISTEMAS DE AMPLIFICACIÓN COMERCIALES. Las principales características de los mismos se resumen en la tabla 7.

9.1.1. AMTD2 (*Amplified M. tuberculosis Direct assay*). Consiste en una amplificación isotérmica (42°C) mediante una transcripción inversa (TMA). La secuencia diana es el gen 16S rARN. Los amplicones de ARN se identifican por medio de una reacción de hibridación con sondas de ADN marcadas con ésteres de acridina específicas para el complejo *M. tuberculosis*. La detección se realiza por quimioluminiscencia. El proceso completo es autocatalítico, se lleva a cabo en un bloque térmico y no está automatizado. No se incluye ningún control interno que permita detectar inhibiciones y los resultados están disponibles en 2 horas y media. Este sistema cuenta con la aprobación de la FDA para su utilización en muestras respiratorias con baciloscopia positiva y negativa.

Globalmente, los estudios realizados con este sistema evidencian que la sensibilidad es buena en muestras respiratorias con baciloscopia positiva (91,7-100%) y variable, según las series, en muestras con baciloscopia negativa (65,5-92,9%). En muestras extrapulmonares la sensibilidad es alta cuando la baciloscopia es positiva (88-100%) y oscila entre el 63,6-100% cuando la baciloscopia es negativa. En cuanto a la especificidad oscila entre el 92,1-100%. La aparición de falsos positivos (1-7,1%) se relaciona con el valor establecido como punto de corte (*cut-off*) y el intervalo de la denominada zona gris. No se han descrito con este sistema reacciones cruzadas con micobacterias no tuberculosas.

9.1.2. AMPLICOR *M. tuberculosis* (AMPLICOR *M. tuberculosis assay*). El ensayo consta de una amplificación mediante PCR cualitativa de un fragmento de 584 pb del gen 16S rARN presente en todos los miembros del género *Mycobacterium*, seguida de la hibridación del producto amplificado con sondas oligonucleótidas y posterior detección del híbrido mediante reacción colorimétrica. El procesamiento está automatizado (COBAS AMPLICOR). La fase de preparación de la muestra puede realizarse tanto manualmente como de manera automática (AMPLIPREP). Se incluye un control interno que se amplifica simultáneamente con la muestra problema y sirve para detectar la presencia de inhibidores. Los resultados están disponibles en 6-7 horas. Este sistema cuenta con la aprobación de la FDA para su utilización en muestras respiratorias con baciloscopia positiva. Se han realizado numerosos estudios con este sistema tanto en muestras respiratorias como no respiratorias. Los resultados son difícilmente comparables debido a la heterogeneidad de los trabajos. Globalmente, los estudios evidencian que la sensibilidad es buena en muestras respiratorias con baciloscopia positiva (90-100%) y muy variable, según la serie, en muestras respiratorias con

baciloscopia negativa (50-95,9%). La sensibilidad baja ostensiblemente cuando se procesan muestras extrapulmonares (27,5-85%). En cuanto a la especificidad es muy elevada (91,3-100%). Algunos falsos positivos se han vinculado con reacciones cruzadas con micobacterias no tuberculosas. El número de inhibiciones oscila entre el 1 y el 20%.

9.1.3. DTB BD ProbeTec ET *Direct TB system*. Consiste en la amplificación isotérmica (a 52,5 °C) mediante el denominado desplazamiento de hebra (SDA) con un sistema de detección en tiempo real. Se co-amplifican dos secuencias diana IS6110 (específica de *M. tuberculosis* complex) y 16S rARN (común a la mayoría de micobacterias). El proceso consta de un mellado del ADN bicatenario de la secuencia diana por la acción de una endonucleasa de restricción, seguido de una fase de elongación en la que se sintetiza una nueva hebra que desplaza a la previamente existente. El ADN replicado y las hebras desplazadas sirven de sustrato para nuevas fases repetitivas. Tanto la amplificación como la detección están automatizadas. Las sondas de detección están marcadas con un colorante fluorescente y un “quencher” que impide la emisión de cualquier señal fluorescente.

Al incrementarse la cantidad del producto amplificado e hibridar las sondas con él pasan a ser moléculas de doble cadena susceptibles a la acción de las endonucleasas, lo que se traducirá en un incremento de la señal fluorescente que se detectará mediante un sistema cinético de lectura fluorométrica en tiempo real. La duración de todo el proceso es de 3 a 4 horas. Se incluye un control interno para detectar inhibiciones de la reacción de amplificación, trabaja con pocillos sellados y los reactivos no precisan refrigeración. Actualmente no cuenta con la aprobación de la FDA. El fabricante recomienda su utilización en muestras respiratorias. Los estudios realizados evidencian que la sensibilidad es buena en muestras con baciloscopia positiva (98,5-100%) y muy variable, según la serie, en muestras con baciloscopia negativa y de origen extrapulmonar (33,3-85,7%). La especificidad como la mayoría de estas técnicas es muy elevada (98,9-100%). No se han descrito reacciones cruzadas con otras micobacterias y el número de inhibiciones notificados es variable (0,3-14%).

9.1.4. INNO-LiPA RIF.TB *line probe assay*. Consiste en una amplificación mediante *nested*-PCR (reamplificación) de una región de 70 pb del gen *rpoB* que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa presente en todos los miembros del complejo *M. tuberculosis*, seguida de una hibridación reversa. La biotina que actúa de marcador se incorpora durante la fase de amplificación, así el producto amplificado biotinilado es posteriormente desnaturalizado e

Tabla 7. Sistemas comerciales de amplificación genética para la detección directa del complejo *M. tuberculosis* en la muestra clínica.

Nombre comercial	Método de amplificación	Diana	Volumen de muestra (µl)	Técnica de detección	Automatización	Control interno	FDA
AMTD2	TMA	16S rRNA	450	Quimioluminiscencia	NO	NO	SI
AMPLICOR	PCR	16S rRNA	100	Colorimétrica	SI	SI	SI
DTB	SDA	IS6110 / 16S rRNA	500	Fluorométrica (ET)	SI	SI	NO
LiPA	Nested PCR	<i>rpoB</i>	500	Colorimétrica	SI	NO	NO
RealArt MTB	Real Time PCR	16S rRNA	10	Fluorométrica	SI	SI	NO

FDA: Aprobada por la FDA.

hibridado con 10 sondas oligonucleótidas inmovilizadas en una tira reactiva a modo de líneas paralelas. El híbrido se detecta mediante una reacción colorimétrica que está automatizada (AUTOLiPA). El ensayo se completa en aproximadamente 12 horas. El sistema LiPA sirve para detectar el complejo *M. tuberculosis* y, a la vez, la resistencia a la rifampicina. No se incluye ningún control interno que permita detectar inhibiciones. Debido a que la mayoría de los trabajos realizados hasta la fecha se centran principalmente en la detección de resistencia a la rifampicina partiendo de cultivos y no directamente de muestras clínicas, no se dispone de datos de sensibilidad y especificidad sobre la misma ni cuenta con la aprobación de la FDA.

9.1.5. RealArt *M. tuberculosis* TM PCR kit. Consiste en una amplificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real de una región de 163 pb del gen 16S ARN, específica del complejo *M. tuberculosis*. El producto amplificado se detecta con fluorocromos que van acoplados a sondas oligonucleótidas que hibridan específicamente con la secuencia diana. La señal fluorescente en el transcurso de la PCR a tiempo real hace posible la detección y la cuantificación del producto, sin necesidad de volver a abrir los tubos de reacción. El procesamiento está automatizado (ABI PRISM). Se incluye un control interno para detectar inhibiciones de la reacción de amplificación y éste además puede emplearse para monitorizar las pérdidas de ADN durante la fase de preparación de la muestra.

La PCR cuantitativa permite determinar el número de copias/ml presentes en la muestra inicial. El fabricante sitúa el límite de detección entre 0,6-1 copia/µl. Dada la reciente aparición no cuenta con la aprobación de la FDA ni se dispone de datos sobre su rentabilidad.

9.2. SISTEMAS DE AMPLIFICACIÓN CASEROS.

El método de amplificación elegido suele ser la PCR (incluyendo los protocolos de reamplificación mediante *nested*-PCR, y más recientemente PCR en tiempo real). La secuencia diana más habitual es la IS6110, aunque también se han publicado numerosos trabajos con otras (*hsp65*, *MBP64*, *rpoB*, etc.).

Deben emplearse reactivos de referencia y extremarse las medidas para mantener un adecuado

control de calidad que permita la monitorización completa del ensayo. Sin embargo, la falta de estandarización de los diferentes protocolos hace desaconsejable su uso fuera del campo de la investigación.

9.3. MICOBACTERIÓFAGOS.

En los últimos años, ha aparecido la aplicación de bacteriófagos, con afinidad específica por las micobacterias, para la identificación de *M. tuberculosis*. Desde 1947 se han descrito más de 250 micobacteriófagos. No obstante, tan sólo dos métodos, el LRP (*Luciferase Reporter Phage*) y el *FASTPlaqueTB* o *PhageTeK MB* (según el fabricante) han demostrado tener cierta utilidad clínica. Estos métodos se diferencian básicamente en la detección de las células micobacterianas infectadas por el fago. En el LRP se utiliza la emisión de luz que está codificada por el gen de la luciferasa, el cual se encuentra incorporado en el genoma del fago. Este enzima es un indicador de la presencia de células micobacterianas viables. En el *FASTPlaqueTB* o *PhageTeK MB*, la detección se basa, tan sólo, en la presencia de múltiples células micobacterianas infectadas viables tras una amplificación fágica (micobacteriófago D29) en *M. smegmatis*. El LRP ha demostrado ser útil en la diferenciación entre *M. tuberculosis* y MNT a partir de cultivo, así como en las pruebas de sensibilidad a la isoniazida y rifampicina. El *FASTPlaqueTB* o *PhageTeK MB* son productos comerciales para el diagnóstico de tuberculosis en muestras respiratorias, así como las pruebas de sensibilidad a la rifampicina para este microorganismo. En general, se trata de unas técnicas sencillas, rápidas (48 h) y relativamente económicas que requieren poco entrenamiento. Sin embargo, deben tenerse en cuenta los diversos problemas de sensibilidad y especificidad observados en los escasos estudios realizados, lo que limita su utilidad. Por ello, tal vez, una posible aplicación de estos métodos en laboratorios con recursos limitados, especialmente en países en vías de desarrollo, debería reservarse a los pacientes con baciloscopia negativa y una elevada sospecha clínica de padecer tuberculosis.

10. PRUEBAS DE DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD

10.1. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD EN *Mycobacterium tuberculosis*

10.1.1. Concepto de resistencia a los fármacos.

Resistencia clínica y resistencia microbiológica. En términos generales se habla de resistencia cuando el tratamiento pierde parcial o totalmente su eficacia. Desde un punto de vista clínico, no se produce la evolución del paciente hacia la curación, como es de esperar, con persistencia o reaparición de los síntomas. En la sospecha de resistencia al tratamiento en un paciente, se utilizan los siguientes criterios: 1) persistencia de los síntomas clínicos a los dos meses de tratamiento seguido correctamente; 2) recaída de la enfermedad poco después de finalizar el tratamiento; 3) persistencia de cultivos positivos a los cuatro meses de tratamiento; 4) en países en vías de desarrollo, donde la baciloscopia es prácticamente la única herramienta diagnóstica, la positividad a los dos meses se considera indicación de cambio en el tratamiento. Este último criterio pierde consistencia en áreas donde es posible la realización de cultivos y estudios de sensibilidad. Un factor adicional que puede apoyar la sospecha de resistencia es el antecedente de tuberculosis.

La confirmación definitiva de la resistencia debe realizarse con métodos microbiológicos que comprueben la eficacia de cada fármaco. Se considera que *una cepa es resistente* cuando el 1% del inóculo de la población bacteriana en estudio es resistente a una concentración prefijada de un determinado fármaco.

10.1.2. Clasificación epidemiológica de las resistencias. Desde el punto de vista del paciente, tener una cepa resistente implica mayor gravedad de su enfermedad, con cambios en el tratamiento, tanto en el número y tipo de fármacos como en el período durante el que se deben administrar. Por otra parte, la garantía de curación es menor y la posibilidad de efectos adversos y de secuelas funcionales aumenta.

Con un enfoque epidemiológico es importante cuantificar las resistencias y, sobre todo, su origen. La clasificación epidemiológica de las resistencias ha experimentado diversos cambios en los últimos 40 años. La OMS, en el año 2000, definió las siguientes categorías:

- Resistencia en casos nuevos:** cepas aisladas en pacientes que nunca han recibido tratamiento antituberculoso durante más de 1 mes. Corresponde a la antes conocida como *resistencia primaria*.
- Resistencia en casos tratados:** cepas aisladas en pacientes que previamente han recibido tratamiento antituberculoso durante más de 1 mes. Corresponde a la que se conocía como *resistencia adquirida*.
- Multiresistencia:** resistencia conjunta a isoniacida y rifampicina.

d) **Polirresistencia:** resistencia a más de un fármaco sin que estén incluidos isoniacida y rifampicina simultáneamente.

e) **Resistencia combinada:** suma de todas las resistencias en un área determinada. Indica la carga de cepas resistentes presentes en una comunidad.

La denominación actual de resistencia en casos nuevos y previamente tratados es más adecuada que la anterior, ya que se basa en un criterio objetivo y no en la génesis última de la resistencia en cada caso, que muchas veces es imposible demostrar. Posee implicaciones epidemiológicas importantes debido a que se considera que la resistencia en casos previamente tratados es debida a deficiencias corregibles en el control de la enfermedad en un área determinada. La resistencia en casos nuevos sería debida a mutaciones espontáneas en el mismo paciente o al contagio a partir de cepas resistentes.

10.1.3. Base microbiológica del tratamiento combinado.

La etapa antibiótica de la tuberculosis se inició en 1944 con la estreptomycin. Poco después se introdujeron el ácido para-amino-salicílico (PAS) y la isoniacida, todos en monoterapia. Pronto se observó que después de unas semanas de mejoría clínica, la enfermedad reemprendía su curso. Se atribuyó a la selección de las bacterias resistentes, después de la eliminación inicial de las sensibles. La primera pauta combinada se utilizó en 1958. Pocos años después, con la introducción de la rifampicina, el etambutol y más tarde de la pirazinamida, comenzaron los tratamientos eficaces. Las pautas actuales incluyen 3-4 fármacos en una primera fase de ataque en la que se eliminan la mayoría de las bacterias de las lesiones y una segunda fase con dos fármacos, eficaz frente a la población latente, menos activa metabólicamente.

La resistencia de *M. tuberculosis* a los fármacos es de origen cromosómico. Se acepta que pueden surgir mutaciones espontáneas que causen resistencia sin exposición previa al tratamiento. Por otra parte, las mutantes pueden aparecer por la presión antibiótica en el curso de tratamientos inadecuados. En estudios llevados a cabo durante los años 1960 por Canetti y Grosset, se estableció la frecuencia de mutaciones espontáneas asociadas a cada fármaco. Así, aparecía una mutante resistente cada 10^5 - 10^7 bacterias para la isoniacida, el etambutol y la estreptomycin; entre 10^7 - 10^9 para la rifampicina y cada 10^2 - 10^4 para la pirazinamida. La frecuencia teórica de mutantes resistentes para más de un fármaco sería la suma exponencial de las individuales de cada fármaco. Del mismo modo, se establecieron las poblaciones bacterianas presentes en las lesiones, desde 10^3 - 10^5 en infiltrados de poca extensión hasta 10^7 - 10^9 en cavidades. Como consecuencia de ello, es extremadamente improbable generar una mutación simultánea a más de dos fármacos. Por ello, en los tratamientos actuales se administran 3-4 fármacos

simultáneamente, hasta reducir drásticamente la población bacteriana.

En 1979, Mitchison definió las poblaciones bacterianas existentes en las lesiones tuberculosas. Una primera población, *extracelular*, activa y creciendo a pH neutro, que sería la mayoritaria y frente a la cual la isoniacida sería el fármaco más activo. Una segunda población formada por *bacilos intracelulares*, menos activos y en ambiente ácido, donde la pirazinamida sería el fármaco más útil. Una tercera población, de *bacilos latentes* poco activos, en el interior de las *lesiones caseosas*. Probablemente la rifampicina sería el fármaco más efectivo a este nivel. Por último, quedaría una población muy minoritaria, formada por *bacilos durmientes*, inactivos durante períodos prolongados, en el curso de los cuales no serían susceptibles a los fármacos. Las dos últimas poblaciones estarían implicadas en las recidivas y en las reactivaciones, y justificarían la larga duración del tratamiento.

10.1.4. Situación mundial de la resistencia a los fármacos. El factor de mayor impacto para disminuir las resistencias es la eficacia de las actividades de control. A pesar de la casi universalización de los tratamientos supervisados propuestos por la OMS, en muchos países en vías de desarrollo las actividades de control son deficientes, reflejándose en una mayor proporción de cepas resistentes. Un reciente proyecto de la OMS y la UNION (Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades del Pulmón, antiguamente denominada IUATLD) llevado a cabo entre 1994 y 1999 ha demostrado que en amplias áreas de Sudamérica, Asia y en gran parte de África, se observan tasas de prevalencia de cepas resistentes superiores al 10% de los pacientes, detectándose en 14 países tasas de multiresistencia superiores al 3% de las cepas. En estas zonas, la epidemia por el VIH contribuye a agravar el problema, como sucede en muchos países africanos, donde la prevalencia del virus puede alcanzar el 15-20% de la población.

En la Unión Europea y Norteamérica, donde las actividades de control son más eficientes, durante los últimos años se han observado tres fenómenos distintos que inciden o han incidido en la prevalencia de las resistencias. Primeramente, la aparición, sobre todo en la década de 1990 en Estados Unidos, de brotes por cepas multiresistentes en pacientes infectados por el VIH con inmunosupresión avanzada, pertenecientes a colectivos marginales y que causaron una elevada mortalidad. En el último decenio, también se ha asistido a un fenómeno sin precedentes derivado de la disgregación de la Unión Soviética. Ello comportó una pérdida de control en zonas donde se administraban fármacos con regularidad, ocasionando una administración anómala de los tratamientos y tasas de resistencia muy elevadas, superiores al 30% en zonas como Lituania o áreas próximas a Moscú. Por último, la inmigración de población procedente de

países en vías de desarrollo, que se observa desde hace unos años, ha dado lugar a una estabilización o disminución del descenso de casos de tuberculosis en muchos países europeos, afectando también a la prevalencia de cepas resistentes.

10.1.5. Indicaciones del estudio de sensibilidad. Existe un amplio consenso respecto a su indicación ante la sospecha de fracaso clínico del tratamiento y ante la recidiva de la enfermedad. En nuestro entorno, también se acepta su realización en inmigrantes de países con una elevada prevalencia de resistencia a los fármacos antituberculosos, y en niños. Sin embargo, su utilización sistemática es polémica, con abundantes ejemplos para ambas posturas en la literatura nacional e internacional. Los argumentos en contra se han basado en la escasa frecuencia de la resistencia sin indicación clínica en países desarrollados y en la complejidad técnica y logística en su realización. Los métodos existentes actualmente invalidan el segundo argumento en los laboratorios con capacidad para la realización de cultivos micobacterianos. Por otra parte, los brotes producidos en los últimos años y la creciente inmigración aconsejan el cribado de todas las cepas circulantes, ya que las complicaciones derivadas de una resistencia no sospechada pueden tener una grave repercusión para el enfermo, considerando las limitaciones del arsenal terapéutico. Otro de los argumentos utilizados en contra, el crematístico, es difícilmente sostenible dada la amplia utilización de las pruebas de sensibilidad para otros microorganismos y la disponibilidad actual de diversas versiones metodológicas muy ajustadas económicamente.

10.1.6. Métodos fenotípicos convencionales para la detección de resistencias

10.1.6.1. Métodos basados en medios de cultivo sólidos. Los métodos fenotípicos se basan en la realización del estudio de sensibilidad frente a los fármacos utilizados en el tratamiento. En la década de 1960, la OMS encargó a un grupo de expertos definir la metodología para la realización de dichos estudios. Se propuso la utilización de medios de cultivo sólidos, con concentraciones fijas de antibióticos capaces de diferenciar sensibilidad de resistencia y se aceptaron tres métodos distintos de interpretación: a) la **ratio de resistencia**, descrito por Mitchison, que compara la CIM (concentración inhibitoria mínima) de una determinada cepa con la de una cepa de referencia; b) las **concentraciones absolutas**, descrito por Meisser, que compara el número de colonias en presencia del fármaco, con el número de colonias en medio de cultivo sin el fármaco; y c) las **proporciones críticas**, descrito por Canetti y Grosset, en que se comparan las colonias crecidas en diferentes diluciones con las presentes en medio sin antibiótico, interpretando el resultado a través de la proporción de colonias capaces de crecer en presencia del fármaco. Éste último es el más utilizado y la mayoría de métodos

actuales se derivan de él. Inicialmente la técnica se diseñó para su utilización en medio de Löwenstein-Jensen y para los fármacos de primera línea, exceptuando la pirazinamida. Poco después se estandarizó para los medios 7H10 y 7H11 de Middlebrook. En ambos casos se incluyen dos diluciones distintas del inóculo y dos concentraciones de cada antibiótico. Las concentraciones de antibióticos utilizadas varían en algunos casos dependiendo del medio de cultivo. Los factores limitantes más importantes son el período de incubación, de 3 a 4 semanas, y el cálculo del inóculo, debido a la tendencia de *M. tuberculosis* a formar agregados no homogéneos. La utilización del medio de Löwenstein-Jensen añade complejidad al método debido a la laboriosidad de su preparación y la necesidad de coagular el mismo a una temperatura elevada que puede dañar al antimicrobiano. Estos factores y las condiciones de bioseguridad han relegado durante mucho tiempo la realización de estudios de sensibilidad a los centros de referencia. Estas mismas razones y el coste, también han influido en su escasa aplicación en los países en vías de desarrollo. Por todo ello, desde los años 1970 se han realizado esfuerzos para conseguir métodos más sencillos y más rápidos. Hasta los años 1980, la mayoría de alternativas fueron optimizaciones más rápidas del método sólido, como el estudio directo a partir de muestras con baciloscopia positiva o la observación microscópica de microcolonias creciendo sobre finas capas de agar, que consiguieron escasa repercusión, probablemente por entrañar una mayor complejidad y requerir mayor experiencia. Más reciente es el uso del método E-test, basado en la utilización de tiras impregnadas de antibiótico, aplicadas directamente sobre placas de medio de cultivo y que aporta la ventaja de determinar la CIM del fármaco gracias al gradiente de concentraciones del antibiótico a lo largo de la tira. Se trata de un método sencillo, aunque requiere cierta experiencia en su lectura y tiene un coste superior al resto de técnicas basadas en medio sólido.

10.1.6.2. Métodos basados en medios de cultivo líquidos. Los métodos basados en medios de cultivo líquido constituyen actualmente la opción más utilizada en los países desarrollados. Presentan, frente a los cultivos sólidos, ventajas en aspectos clave como el tiempo de incubación, la estandarización del inóculo y la lectura automatizada o semiautomatizada. Durante los últimos 15-20 años, el método más extendido ha sido el radiométrico (Bactec 460TB). Se basa en la utilización de los mismos viales del cultivo, con medio 7H9 modificado, inoculados con la cepa a estudiar y conteniendo la concentración adecuada de un antibiótico. El tiempo de incubación se acorta, obteniendo resultados en 5-12 días. La estandarización del inóculo se logra utilizando un crecimiento con una determinada lectura radiométrica,

a partir de muestras o cepas. Los viales de la cepa a estudiar se leen diariamente, interpretándose la sensibilidad y resistencia según la progresión de las lecturas de crecimiento respecto al control sin antibiótico. La casa fabricante indica con precisión las condiciones de realización e interpretación del resultado, asegurando su reproducibilidad. Actualmente se considera el método de referencia más rápido. Sin embargo, posee una serie de inconvenientes como son el manejo de sustancias radiactivas y la escasa automatización.

En los últimos años han aparecido diversos sistemas no radiométricos para las pruebas de sensibilidad. Los más extendidos son el BACTEC MGIT 960, el MB/BacT ALERT 3D y el ESP Culture System II. Utilizan un medio de cultivo 7H9 modificado y el crecimiento se evidencia mediante la detección del CO₂ producido o del consumo de O₂ (ver el apartado 7 de cultivos). Todos ellos han sido evaluados previamente para el cultivo. El más utilizado es el sistema MGIT 960, que ha demostrado un rendimiento parecido al radiométrico, al igual que el ESP Culture System II. Las ventajas principales son la incubación automatizada y la ausencia de radiactividad en el proceso. Como inconvenientes cabe señalar una mayor manipulación durante la realización de la técnica, con el consiguiente riesgo de contaminación, y la escasa flexibilidad en la valoración de las lecturas de crecimiento. Con el sistema MB/BacT ALERT 3D la experiencia es limitada. Además algunos problemas administrativos han impedido hasta ahora su expansión como método para las pruebas de sensibilidad.

10.1.6.3. Determinación de sensibilidad a la pirazinamida. La determinación de la sensibilidad a este antibiótico requiere especial mención. El metabolito eficaz, el ácido pirazinoico, actúa a pH ácido (pH=5,5). Ello implica que el pH del medio de cultivo debe adecuarse a estas condiciones. Sin embargo, hasta un 10% de los aislamientos de *M. tuberculosis* son incapaces de crecer a este pH. Se ha conseguido una adaptación estableciendo un pH de 6 y compensando con una mayor concentración del antibiótico. Basado en esta premisa, el método radiométrico logra un crecimiento en la práctica totalidad de las cepas. Sin embargo, los nuevos sistemas no radiométricos recientemente introducidos en la detección de pirazinamida, aún no han conseguido resultados óptimos similares al radiométrico.

Con los métodos sólidos también se ha realizado una adaptación del pH para el estudio de la pirazinamida. Sin embargo, las dificultades de crecimiento en algunas cepas persisten. Por ello, el método considerado de referencia continúa siendo el radiométrico.

10.1.6.4. Determinación de sensibilidad frente a los fármacos de segunda línea. Está indicada en cepas

con resistencia frente a los fármacos de primera línea. Debido a su utilización más restringida, la estandarización de la técnica es menor. Los fármacos que se estudian en la mayoría de los casos son etionamida, kanamicina, cicloserina, capreomicina y en menor grado el PAS. En general se acepta que puede realizarse en medio sólido (7H10) y con el método radiométrico, con criterios similares a los utilizados para los fármacos de primera línea. Los resultados son reproducibles para los distintos fármacos, con la excepción de la cicloserina, por lo que en la actualidad no se recomienda su estudio.

Durante los últimos años se han incluido en las opciones de tratamiento otros fármacos, como son ofloxacin, amikacina y rifabutina. Asimismo, existen algunos de utilidad potencial como moxifloxacino, levofloxacino, linezolid y claritromicina, entre otros. Para todos ellos no se ha desarrollado aún un protocolo claro de determinación de la sensibilidad.

10.1.7. Métodos fenotípicos no convencionales. En la literatura existen numerosos ejemplos de métodos más o menos ingeniosos, diseñados para determinar la resistencia a los fármacos de una forma más rápida que los métodos convencionales. Uno de los más conocidos es la *detección de actividad ATP* de la micobacteria en presencia de antibiótico mediante bioluminiscencia. Otros son los basados en *técnicas colorimétricas* o de *citometría de flujo*, con la finalidad de detectar micobacterias capaces de hidrolizar diacetato de fluoresceína.

Los métodos basados en la *utilización de fagos* son los que han adquirido mayor relieve en los últimos años (ver apartado 9). Existen dos variantes de utilización de estos, aquellos en los que los fagos han sido manipulados y contienen el gen de la luciferasa y los que utilizan fagos silvestres. Cuando los fagos se añaden a un cultivo en presencia de antibiótico, estos infectarán únicamente a las micobacterias viables, que serán las resistentes a dicho antibiótico. Cuando contengan el gen de la luciferasa podrán detectarse mediante un luminómetro. Los fagos silvestres pueden detectarse indirectamente infectando en una segunda fase cultivos de una micobacteria de crecimiento rápido (*M. smegmatis*) de forma que, si el fago está presente debido a la infección de *M. tuberculosis* resistente, infectará el nuevo cultivo, hecho que se evidencia con la formación de calvas en el crecimiento de *M. smegmatis*.

No obstante, los métodos no convencionales no se han evaluado con amplitud y su utilización aún está restringida. En parte es debido a las dificultades de estandarización y a cierta reticencia entre los profesionales a la utilización de métodos en los que no se evalúa directamente la dualidad antibiótico / crecimiento bacteriano.

10.1.8. Métodos genotípicos. Los métodos genotípicos se basan en la detección de las alteraciones genéticas que condicionan resistencia a

los diferentes fármacos. Potencialmente pueden detectarse estas alteraciones con gran rapidez, incluso directamente en las muestras clínicas. Sin embargo su principal inconveniente es que, con excepción de la rifampicina, no se conocen las alteraciones genéticas que causan entre el 20 y el 40% de las resistencias a la mayoría de los fármacos de primera línea.

10.1.8.1. Mecanismos moleculares de la resistencia a los fármacos de primera línea

a) Resistencia a la isoniacida. Está asociada fundamentalmente a dos genes: el gen *katG* y el gen *inhA*. El primero codifica el enzima catalasa-peroxidasa, implicada en la transformación de la isoniacida en su compuesto activo. Determinadas alteraciones del gen provocan resistencia al impedir la activación del fármaco. La mutación más frecuente en este gen afecta al codón 315, provocando un cambio de aminoácido. Se han descrito otras mutaciones en el gen, algunas de ellas silentes y otras de significado desconocido. El gen *inhA* codifica la enzima enoil ACP reductasa que participa en la síntesis de la pared bacteriana. En la zona reguladora del gen (RBS) se han descrito mutaciones que provocan un aumento de la enzima, compensando la acción inhibitoria del antibiótico. También se han descrito, aunque menos frecuentes, mutaciones en la zona estructural del gen, que modificarían el enzima impidiendo su reconocimiento por parte del antibiótico. En cepas resistentes se han detectado mutaciones en el gen *ahpC* aunque se cree que son para compensar la acción del gen *katG* cuando éste se encuentra mutado. Otros genes, como *kasA*, *furA*, y *ndh*, también se han relacionado con la resistencia a la isoniacida, pero su papel es incierto. Se ha descrito una relación entre la CIM de isoniacida y las mutaciones halladas. Así, las alteraciones en el codón 315 del gen *katG* suelen asociarse a resistencia superior a 1 µg/ml, mientras que las vinculadas al gen *inhA* suelen ser inferiores o iguales a esta concentración. También se ha observado la asociación de resistencia cruzada con etionamida y mutaciones en el gen *inhA*.

b) Resistencia a la rifampicina. Esta se encuentra, prácticamente en todos los casos, relacionada con alteraciones en el gen *rpoB*, que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa, causando interferencias en la transcripción. La mayoría de las cepas tienen alteraciones en una zona de 81 pb del gen que se conoce como *región determinante de la resistencia a la rifampicina* (RDRR). Las mutaciones más frecuentes son las que afectan a los codones 456 y 451. Al igual que con la isoniacida, se ha observado relación entre las CIM y las mutaciones. Así, las mutaciones de los codones 451 y 456 se asociarían a CIMs superiores a 32 µg/ml, mientras que las de los codones 436, 441, 443 y 447 se vincularían a CIMs más bajas. Las mutaciones del codón 441 a menudo no suponen resistencia cruzada con la rifabutina.

c) Resistencia al etambutol. Está causada por alteraciones del enzima arabinosil transferasa, que interviene en la síntesis de la pared celular. En la mayoría de casos se debe a cambios en los tres genes del operón *emb*, siendo los más frecuentes las mutaciones estructurales en los codones 306, 328, 406 y 497 del gen *embB*. Las mutaciones estructurales se correlacionan más con CIMs altas, mientras que las CIMs inferiores se asocian a sobreexpresiones de las proteínas *emb*.

d) Resistencia a la estreptomycin. Las alteraciones responsables se han localizado en los genes *rrs* y *rpsL*, relacionados con la subunidad ribosómica 30S y la síntesis proteica. La mutación más frecuente ocurre en el codón 43 del gen *rpsL*, seguida de mutaciones en los codones 530 y 915 del *rrs*. Las CIMs más elevadas se observan en las cepas con mutaciones en el gen *rpsL*.

e) Resistencia a la pirazinamida. Se asocia, sobre todo, a mutaciones del gen *pncA*, que codifica la pirazinamidasasa que transforma el antibiótico en el principio activo. Se correlaciona con CIMs elevadas.

10.1.8.2. Métodos de detección de las alteraciones genéticas de resistencia. Las principales características de estas técnicas son la rapidez en la obtención de los resultados y su independencia del crecimiento bacteriano. Desde el punto de vista técnico pueden dividirse en tres grupos: las que se interpretan por electroforesis, las basadas en hibridación y las que se fundamentan en la secuenciación.

10.1.8.2.1. Métodos basados en interpretación por electroforesis. Entre ellos está la técnica de *PCR-SSCP* (*single strand conformation polymorphism*), basada en el estudio de la movilidad de una de las dos hebras de ADN en un gel de poliacrilamida de alta resolución. Una mutación en la secuencia estudiada provoca un cambio conformacional de la cadena alterando su movilidad en el gel. Se trata de un método estandarizado, rápido y sencillo.

Una opción distinta es la técnica de *heteroduplex*, en la que se realiza una amplificación de la zona a estudiar, desnaturalizando posteriormente el producto y mezclándolo con un producto equivalente de una cepa de referencia. Al restablecer las condiciones para la formación de dobles cadenas, si las cadenas de ambos productos son homólogas hibridarán completamente, mientras que si está presente alguna mutación en la cepa a estudiar se formarán heteroduplex, con movilidad electroforética distinta al producto homólogo. También se han diseñado técnicas que tras una amplificación son útiles para la detección de mutaciones producidas en dianas de enzimas de restricción, formando fragmentos de amplificación de distinto tamaño a las secuencias silvestres.

10.1.8.2.2. Métodos basados en hibridación. LiPA (*Line Probe Assay*) es una técnica comercial desarrollada para la detección de las principales mutaciones de la rifampicina. Se basa en la hibridación

del ADN de la cepa problema sobre una membrana en la que están fijadas sondas capaces de detectar individualmente cada una de las mutaciones más conocidas de la RDRR del gen *rpoB*. Se justifica como marcador rápido y sencillo de multiresistencia. Por otra parte, se han desarrollado técnicas no comerciales entre las que destacan las basadas en PCR e hibridación revelada por ELISA y las basadas en equipos de PCR a tiempo real. Estas últimas permiten la amplificación y detección del producto de forma simultánea utilizando sondas marcadas con moléculas fluorescentes, de las que existen diversos tipos como son las sondas Taqman, las sondas FRET y las sondas MGB. Las técnicas de PCR a tiempo real se han aplicado en la detección de las mutaciones implicadas en la resistencia a la rifampicina y a la isoniacida, tanto en aislamientos de cultivo como directamente en las muestras clínicas. Esta última posibilidad ofrece expectativas para detectar la resistencia con gran rapidez. No obstante, existen limitaciones que exigen su perfeccionamiento, como la baja sensibilidad en las muestras con baciloscopia negativa y la necesidad de dirigirse tan sólo a las mutaciones concretas conocidas.

10.1.8.2.3. Técnicas basadas en la secuenciación. En la actualidad se considera el método de referencia, debido a que permite conocer la secuencia concreta de un fragmento, constatando todas las mutaciones presentes. Actualmente únicamente es aplicable a partir de aislamientos de cultivo. Técnicamente es algo más compleja que el resto de los métodos. Sin embargo, existen equipos de secuenciación con un alto grado de automatización que, aunque son costosos, al tener múltiples y variadas aplicaciones permiten que estas técnicas puedan plantearse como una alternativa real.

10.2. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD EN MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS DE CRECIMIENTO LENTO.

En general, las pruebas de sensibilidad para las MNT de crecimiento lento no están bien estandarizadas, y no se ha observado una clara correlación entre los estudios *in vitro* y la eficacia clínica de los tratamientos. No obstante, la correlación de estos estudios son difíciles de valorar, y más cuando la experiencia con estas infecciones es limitada debido a su menor frecuencia y patogenicidad. Para valorar la significación clínica de este grupo de micobacterias y para seleccionar el régimen terapéutico más adecuado se suelen seguir las recomendaciones de la ATS. Sin embargo, una gran parte de estas infecciones no tienen pautas de tratamiento claramente establecidas. Por otro lado, estas especies micobacterianas son más resistentes a los tuberculostáticos que *M. tuberculosis*, lo que dificulta el tratamiento. Por todo ello y, a pesar de las múltiples limitaciones, un resultado de sensibilidad *in vitro* en estos microorganismos puede

aportar una base orientativa y racional a una pauta de tratamiento clínicamente no bien definida.

En la actualidad, del conjunto de MNT de crecimiento lento, se dispone de cierta información útil en determinadas especies (ej., *M. avium-intracellulare* y *M. kansasii*), que puede servir para proponer algunas recomendaciones generales.

10.2.1 Complejo *M. avium*. La mayoría de los aislamientos de este complejo presentan una resistencia intrínseca a la isoniácida y la pirazinamida, y grados variables de resistencia a los aminoglucósidos y las rifamicinas. Los dos últimos grupos podrían tener utilidad en el tratamiento como fármacos de segunda línea en combinación con otros agentes antimicrobianos.

Aunque, en la actualidad, no existe un acuerdo unánime en las indicaciones para la realización de los estudios de sensibilidad en estos microorganismos, existen algunas situaciones recomendables: a) aislamientos clínicamente significativos en pacientes tratados previamente con macrólidos; b) bacteriemia en pacientes que se encuentran en profilaxis con macrólidos; c) aislamientos en pacientes que recaen durante el tratamiento con macrólidos; y d) aislamientos iniciales en pacientes con enfermedad diseminada o respiratoria firmemente diagnosticada. Además, los estudios de sensibilidad deberían repetirse a los 3 o 6 meses, en pacientes con enfermedad diseminada o pulmonar crónica, respectivamente, y que no muestren una mejoría o incluso un deterioro clínico y los cultivos permanezcan positivos.

Los macrólidos (claritromicina y azitromicina) son el único grupo de fármacos con correlación demostrada entre los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* y la respuesta clínica de los pacientes. El NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) recomienda únicamente analizar la sensibilidad del complejo *M. avium* a los macrólidos, y propone a la claritromicina como patrón para el resto de fármacos de esa familia. El método aconsejado es la dilución (indistintamente macro o microdilución) en caldo con 7H9 de Middlebrook o Mueller-Hinton suplementado con OADC (ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa) u OAD (ácido oleico-albúmina-dextrosa). La lectura de la CIM se deberá realizar a los 7 días. Existe controversia con respecto al pH del medio ya que puede afectar a los macrólidos, siendo recomendable un pH de 7,4. Un aspecto importante son las concentraciones de fármaco a estudiar. En el caso de la claritromicina, el intervalo que se debería analizar es de 0,25 a 256 µg/ml para la microdilución y de 2 a 64 µg/ml para la macroliducción mediante el sistema radiométrico BACTEC 460. La interpretación de las CIM se basan en los puntos de corte propuestos: sensible (≤ 16 µg/ml), intermedio (32 µg/ml) y resistente (≥ 64 µg/ml). Estos criterios son para un pH de 6,8 que es el disponible comercialmente en los viales 12B del

sistema BACTEC 460.

10.2.2. *M. kansasii*. En los tratamientos habituales de las infecciones por esta especie se incluye la isoniácida, la rifampicina y el etambutol. Aunque estos fármacos son, por lo general, clínicamente activos frente a las cepas no tratadas previamente, el desarrollo de resistencias es un hecho conocido. El fracaso del tratamiento se suele asociar fundamentalmente con la resistencia a la rifampicina, aunque también se ha documentado con la isoniácida y el etambutol. En la actualidad, la rifampicina es el fármaco que se recomienda analizar en todos los aislamientos iniciales.

A diferencia de otras MNT de crecimiento lento existe una buena estandarización y correlación entre el método de las proporciones en agar (7H10), microdilución en caldo (7H9 o Mueller-Hinton) y el sistema BACTEC radiométrico. La concentración crítica para rifampicina es de 1 µg/ml y cuando se demuestre resistencia a la misma se deberían estudiar otros fármacos: rifabutina (0,5 µg/ml), isoniácida (1 µg/ml), etambutol (5 µg/ml), estreptomina (10 µg/ml), claritromicina (32 µg/ml), amikacina (10 µg/ml), ciprofloxacino (2 µg/ml) y cotrimoxazol (2/38 µg/ml). La elevada concentración crítica que se utiliza en el caso de la isoniácida se debe a que *M. kansasii* presenta de forma natural una sensibilidad disminuida a este fármaco en comparación con *M. tuberculosis*.

10.2.3. *M. marinum*. No se recomienda la realización de forma rutinaria de estudios de sensibilidad. Si la infección resulta intratable o recidivante, se recomienda analizar la rifampicina y el etambutol por el método de las proporciones o por microdilución; mientras, se aconseja estudiar la actividad de la doxiciclina, claritromicina, cotrimoxazol y amikacina sólo por microdilución.

10.2.4. Otras MNT. En el caso de otras especies como *M. xenopi*, *M. malmoense* o *M. simiae*, se recomienda analizar los mismos fármacos y a las mismas concentraciones que en *M. kansasii*, aunque no existe una recomendación precisa sobre el método a utilizar. En aquellas especies cuya relevancia clínica es anecdótica (ej., *M. gordonae*), se desaconseja realizar pruebas de sensibilidad.

10.3. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD EN MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO.

El tratamiento de las infecciones causadas por micobacterias de crecimiento rápido es distinto que el del resto de micobacterias. En particular, es muy diferente del tratamiento de la tuberculosis. Esto se debe a la diferente sensibilidad *in vitro* de estos organismos, que resultan ser resistentes a los tuberculostáticos convencionales, mientras que pueden ser sensibles a otros antibióticos de uso más amplio. Sin embargo, como la sensibilidad de estos microorganismos no es uniforme, se recomienda el

estudio individualizado de cada aislamiento, puesto que los resultados pueden tener considerable trascendencia. No obstante, los estudios más amplios tienen la utilidad de permitir orientar el tratamiento empírico de estas infecciones mediante el conocimiento global de estas MNT en áreas geográficas específicas.

En la actualidad la microdilución en caldo es la técnica estándar para determinar la sensibilidad de estas bacterias. Sin embargo, esta técnica no es fácilmente realizable en la mayoría de laboratorios asistenciales, y la relativa lentitud de los laboratorios de referencia puede ser un inconveniente a la hora de tratar pacientes con enfermedades graves. Por ello, es necesario un método más accesible para un primer estudio. En los últimos años se ha introducido la técnica del E-test, que ha resultado ser útil para este propósito, aunque los resultados deberían confirmarse por la técnica de referencia. El empleo de otras técnicas como la de difusión con discos no es recomendable, ya que no están bien estandarizadas y los resultados obtenidos no se correlacionan adecuadamente con los de la técnica de referencia. Por ello, para el estudio de la sensibilidad individual en los laboratorios clínicos la técnica a emplear debería ser el E-test, quedando la microdilución reservada a los laboratorios de referencia y/o a grandes estudios de sensibilidad con un elevado número de cepas.

11. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Entendemos como tal la tipificación o caracterización molecular de cepas de una misma especie que permite conocer los aislamientos procedentes de individuos y relacionarlos con otros para determinar las cadenas de transmisión de la enfermedad.

11.1. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *M. tuberculosis*

En los últimos años, la tipificación molecular de aislamientos de *M. tuberculosis* ha demostrado ser la herramienta no diagnóstica más importante en el manejo de la tuberculosis. Se ha aplicado al estudio de casos concretos en la investigación de brotes, así como a una población general y a grupos específicos, permitiendo obtener una amplia información sobre la transmisión de la enfermedad y sus factores de riesgo, así como de la capacidad de contagio de las cepas resistentes. También se ha utilizado para confirmar o descartar sospechas de contaminación cruzada en los laboratorios.

11.1.1. Métodos de tipificación de *M. tuberculosis*.

Hasta hace una década los únicos marcadores disponibles para estudiar la epidemiología de la tuberculosis eran el patrón de sensibilidad (antibiotipo) y los fagotipos. El primero tiene un poder discriminatorio casi nulo, y la fagotipia es bastante limitada, ya que el espectro de posibles fagos detectables en los aislamientos clínicos es escaso.

Posteriormente se desarrollaron métodos basados en restricción con endonucleasas y la consiguiente separación por electroforesis (REA). La gran cantidad de fragmentos generados por las endonucleasas hace muy difícil la comparación entre diferentes aislamientos, por lo que su repercusión en la práctica ha sido muy escasa.

Los requisitos ideales que debería reunir un método de tipificación serían: elevado grado de discriminación, metodología sencilla y rápida, coste económico mínimo, resultados reproducibles, aplicabilidad directa sobre muestras clínicas, y utilidad para discriminar los restantes componentes del complejo *M. tuberculosis*. Ningún método de los conocidos actualmente reúne todas las condiciones.

11.1.1.1. **Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) de la IS6110.**

Es la técnica de tipificación más conocida y utilizada. El método se basa en el variable número de copias de la secuencia de inserción IS6110 que presentan las diferentes cepas (de 0 a 25) y en su posición en el genoma. La técnica se inicia con la extracción de ADN de la bacteria y su digestión con la enzima *PvuII*, que posee una única diana en los 1355 pb de la IS6110. Los fragmentos se separan por electroforesis y se transfieren a una membrana de ADN. Posteriormente se efectúa una hibridación con una sonda marcada con peroxidasa y que es complementaria al fragmento derecho de la digestión. El patrón de hibridación puede revelarse mediante una autorradiografía. Para facilitar la comparación entre los laboratorios el protocolo de la técnica está totalmente estandarizado.

La utilización de marcadores internos permite comparar los resultados de cepas incluidas en diferentes membranas, neutralizando la variabilidad debida a las condiciones intrínsecas de cada carrera electroforética. Las cepas que poseen el mismo número y posición de bandas, se consideran iguales y pertenecientes al mismo clon. Las cepas que difieren en 1-2 bandas, probablemente hayan estado emparentadas en el pasado. La existencia de un programa informático hábil en el análisis de los patrones de las cepas permitiría, teóricamente, comparar cepas estudiadas separadas geográfica o temporalmente.

Un aspecto importante en los estudios poblacionales es la estabilidad del patrón de las cepas. Es necesario que cambie lo suficientemente rápido como para que cepas sin ningún vínculo no tengan el mismo patrón, y lo suficientemente lento como para que cepas que pertenecen a pacientes relacionados se mantengan iguales. Gracias a estudios poblacionales realizados en Holanda, donde se tipifican todas las cepas desde 1993, se conoce que la estabilidad media del patrón de bandas de las cepas es de 3-4 años.

Actualmente se considera a la RFLP de la IS6110 como la técnica de referencia. Se han establecido bases de datos nacionales e internacionales basadas en sus resultados. Ello permite el seguimiento de brotes, de

determinados genotipos, como el Beijing y la realización de estudios de transmisión que requieren el seguimiento de grandes poblaciones de pacientes durante períodos prolongados de tiempo.

Sin embargo, la RFLP de la IS6110 presenta algunas limitaciones que impulsan la búsqueda de nuevos métodos. Así, precisa de una elevada cantidad de bacterias para obtener el ADN necesario, la técnica es excesivamente larga y compleja, permite el análisis simultáneo de pocas cepas, existen puntos sensibles en el protocolo que pueden afectar la calidad del resultado y el coste económico del programa de apoyo informático es elevado. Por otra parte, existe un porcentaje de cepas con menos de 5 copias de la IS6110 que no pueden clasificarse con este método sin riesgo de atribuir falsas relaciones. También se han descrito cepas que no poseen ninguna copia de la IS6110. Estas cepas se han observado con más frecuencia en la India y otros países orientales. En estos casos debe recurrirse a técnicas alternativas.

11.1.1.2. Spoligotyping. Entre las técnicas alternativas a la RFLP, el *spoligotyping* es la más extendida, de forma que se utiliza habitualmente cuando se observan menos de 5 copias con la RFLP. Se basa en la existencia en el genoma de una zona (región DR), que contiene unas secuencias repetitivas de 36 pb, las DR. Entre éstas hay secuencias espaciadoras que son de composición y longitud variable en diferentes cepas. Tomando como referencia las secuencias espaciadoras de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv y de la cepa P3 de *M. Bovis* BCG, se diseñaron 43 sondas. Estas sondas se alinean y fijan en una membrana. De las cepas a estudiar se amplifica la región DR, utilizando dos iniciadores orientados opuestamente entre ellos y complementarios de la secuencia DR. Durante la amplificación, los iniciadores promoverán productos de múltiples tamaños. Estos productos de PCR se aplican posteriormente sobre la membrana en la que están fijadas las sondas. La hibridación se evidencia por que uno de los iniciadores está marcado con biotina. Es una técnica fácil, basada en la PCR y no requiere grandes cantidades del microorganismo. La lectura se realiza como un código digital y puede usarse como método de cribado, ya que cuando el patrón es distinto, la RFLP también lo es y permite hacer múltiples tipificaciones en poco tiempo.

El principal inconveniente de esta técnica es el menor poder de discriminación respecto a la RFLP, lo cual impide su utilización como técnica de elección definitiva. Sin embargo, posee una ventaja apreciable sobre la RFLP ya que permite visualizar con mayor claridad las cepas no idénticas que forman parte de una familia o de un clon grande. Así, las cepas del genotipo Beijing son fácilmente identificables con esta técnica, al igual que las cepas de *M. bovis*.

11.1.1.3. Otros métodos. En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas, algunas basadas en RFLP, como las de las secuencias IS1081, PGRS, DR o

GTG. Otras basadas en PCR como *Mixed-Linker* PCR, *Mycobacterial interspersed repetitive units* (MIRU), *Fast Ligation mediated* PCR (FliP), *Fluorescent amplified fragment length polymorphism* FAFLP, *Variable numbers of tandem repeats* (VNTR), *Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences* (ERIC-PCR) o *Ligation mediated* PCR (LMPCR) También se han descrito otras técnicas basadas en PCR que se han considerado de escaso poder de reproducción, como DRE-PCR, PCR inversa, *ampliprinting* y PCR con iniciadores arbitrarios. De todas ellas, las que se están utilizando más son las técnicas MIRU, VNTR y FAFLP.

La técnica **VNTR** analiza el polimorfismo de repeticiones en tandem situadas en 7 lugares distintos del genoma. Se basa en la PCR y dependiendo de los tamaños de los productos de PCR puede saberse el número de repeticiones en tandem. Se puede acoplar a un secuenciador. Tiene mayor poder discriminatorio que la de *spoligotyping*, aunque menor que la RFLP.

La técnica **MIRU** se parece mucho a la VNTR. Se basa en la variabilidad en el número de copias de secuencias repetitivas de 40 a 1.000 pb en 12 zonas intergénicas diferentes del genoma de *M. tuberculosis*. La técnica es ligeramente más discriminatoria que la de *spoligotyping*. La técnica MIRU puede utilizarse como método de cribado, ya que permite una discriminación adecuada en la mayoría de los casos, y completarse con la RFLP de la IS6110 cuando se requiera una discriminación adicional.

En el método **FAFLP** el ADN se digiere con dos enzimas, *EcoRI* y *MseI*. Con la ayuda de una ligasa, se unen unas secuencias adaptadoras a los fragmentos de restricción. Para visualizar determinados fragmentos después de la amplificación, el iniciador para el adaptador que se une a la zona que ha cortado *EcoRI*, contiene nucleótidos marcados con diferentes fluoróforos. Los productos de amplificación se visualizan en un gel de poliacrilamida y también pueden leerse en un secuenciador. En algunas cepas ha demostrado mayor poder discriminatorio que RFLP, lo que podría significar que su estabilidad en el tiempo es menor.

La técnica **Mixed-linker PCR** puede ser una técnica con futuro debido a su fiabilidad y poder de discriminación, aunque se ha difundido escasamente.

Otra técnica ocasionalmente utilizada es la electroforesis en campo pulsante (**PFGE**), considerada de referencia en la tipificación de otros microorganismos. No se conoce bien su utilidad, aunque posee los mismos inconvenientes de complejidad que la RFLP de la IS6110. Por último, la utilización de **microarrays** permitiría, en teoría, observar las variaciones de varias localizaciones genéticas de forma simultánea, ya que permiten analizar la hibridación con cientos de sondas. Tiene una potencialidad aún poco explorada.

Las posibilidades reales de sustituir la técnica RFLP de la IS6110 pasarían por encontrar una técnica alternativa con el mismo poder de discriminación y una

gran simplicidad en su realización, ya que debería compensar la información acumulada durante los últimos años en numerosas bases de datos utilizando la técnica RFLP.

11.1.2. Utilidad de la tipificación en la transmisión de la tuberculosis. La realización de la tipificación de las cepas con la técnica RFLP ha permitido reestructurar y actualizar conceptos sobre la transmisión de la tuberculosis. La utilidad de la técnica se basa en la asunción de que las cepas con igual número y disposición de copias de la IS6110 pertenecen a una misma agrupación o *cluster* y forman parte de un grupo de transmisión reciente. Desde este punto de vista, se considera que el primer paciente con tuberculosis dentro del *cluster* es el caso índice y los demás son secundarios.

Hasta hace unos años se consideraba que en los países con baja incidencia de tuberculosis, la mayoría de enfermos correspondían a reactivación endógena de infecciones del pasado. La tipificación sistemática de amplias poblaciones ha evidenciado que las infecciones recientes son causa de un número considerable de casos en estos países, oscilando de una sexta parte hasta casi la mitad. Asimismo, en países de elevada incidencia se observa, además de una proporción importante de infecciones recientes, un número limitado de cepas circulantes responsables de gran parte de los casos, que indicaría una tasa elevada de infección reciente y/o el predominio de determinadas cepas, basado en una mejor capacidad de adaptación o una mayor virulencia. Un ejemplo notable de este hecho es el claro predominio de las cepas del genotipo Beijing en China y otros países orientales. Este hallazgo respecto a la proporción de infección reciente en países de baja incidencia, indicaría la necesidad de adecuar mejor las estrategias de los programas de control a la búsqueda de casos nuevos.

Por otra parte, la tipificación también ha aclarado dudas respecto al papel que pudiera jugar la infección exógena en pacientes que sufren un segundo episodio de tuberculosis. Así, diversos estudios han demostrado que entre el 12 y el 60% de recidivas de la enfermedad se deben realmente a nuevas reinfecciones.

La tipificación también ha aportado información muy valiosa en la transmisión de cepas resistentes. Durante años se pensó que las cepas resistentes no se transmitían, o muy poco, basándose en la escasa proporción de casos secundarios en el entorno de pacientes con tuberculosis resistente y en la descripción de la asociación de resistencia a la isoniazida con mutaciones en el gen *katG*, junto con la pérdida de la actividad catalasa. Actualmente, conocemos que éste es un fenómeno complejo con multitud de matices. La información disponible indica que probablemente tengan disminuida la capacidad de transmisión las cepas resistentes a isoniazida con CIMs elevadas (>1 µg/ml), con alteraciones múltiples en el gen *katG* o en genes no conocidos, mientras que las cepas con CIMs bajas y

mutaciones puntuales, sobre todo en el gen *inhA*, mantendrían gran parte o la totalidad de la capacidad de transmisión. Por otro lado, la resistencia relacionada con los demás antituberculosos no generaría pérdida de la facultad de transmisión, a no ser que estuvieran causadas por delecciones importantes que comprometiesen funciones metabólicas de la bacteria. No obstante, pueden hallarse casos que no obedecen a esta orientación. Un claro ejemplo es el genotipo Beijing y su variante "W", que a pesar de ser multirresistente en muchos casos, se transmite de forma similar a las cepas sensibles. Todo ello indica que la transmisión es un fenómeno multifactorial, en el que, aparte de la cepa, deben considerarse también factores como la exposición y las condiciones inmunitarias del paciente.

11.1.3. Utilidad de la tipificación en el estudio de contactos. Sin duda es una herramienta complementaria muy útil para el estudio convencional de contactos. Sin embargo no son mutuamente sustituibles debido a que analizan eventos distintos. El estudio convencional de contactos investiga la infección de personas del entorno de un caso y la búsqueda de casos secundarios que se producen simultáneamente en el tiempo, mientras que la tipificación abarca períodos más amplios y únicamente puede considerar los casos que han evolucionado a enfermedad. Por ello, la tipificación tiende a relacionar casos que no ha evidenciado el estudio convencional de contactos y para los que no siempre se encuentra una explicación congruente. Estos casos pueden ser debidos a contactos no conocidos y a la reactivación en el mismo período de casos infectados en épocas diferentes y que no expresan transmisión reciente. No obstante, ha aportado información de gran interés a este respecto. Así, se ha visto que la transmisión tras contactos esporádicos es más frecuente de lo que se pensaba y que en algunos pacientes, dependiendo de sus hábitos sociales, la transmisión en el ámbito familiar no es la más importante.

11.1.4. Uso de la tipificación en la caracterización de contaminaciones cruzadas en el laboratorio. En este concepto deben incluirse las contaminaciones producidas en el laboratorio en el curso del procesamiento de las muestras y las relacionadas con tomas de muestra, como son las broncoscópicas.

Algunos autores sugieren que hasta un 3% de los aislamientos corresponden a contaminaciones cruzadas. La importancia de este hecho es elevada por cuanto puede suponer la instauración de un tratamiento innecesario y el cese de exploraciones diagnósticas de procesos alternativos.

La posibilidad de contaminación debe sospecharse cuando el cuadro clínico no encaja adecuadamente, cuando se aísla *M. tuberculosis* únicamente en una de varias muestras y con crecimiento escaso, y cuando se observen varias muestras positivas en un corto período de tiempo o relacionado con una determinada exploración diagnóstica. La tipificación confirma o

descarta las sospechas. Algunos autores recomiendan sospechar contaminación cuando se aíslan cepas con el mismo patrón y que fueron procesadas para el cultivo durante la misma semana.

11.2. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE MICOBACTERIAS DISTINTAS A *M. tuberculosis*

Las técnicas de tipificación aplicadas a otras especies, incluyendo las restantes componentes del complejo *M. tuberculosis*, se utilizan con mucha menor frecuencia, fundamentalmente por obvias razones de incidencia.

11.2.1. Especies del complejo *M. tuberculosis* distintas a *M. tuberculosis*. En el complejo *M. tuberculosis* la diferenciación tiene un doble interés. Por una parte, para detectar los casos atribuibles a *M. bovis* y más raramente *M. africanum*, *M. bovis* BCG, *M. microti* y *M. canettii*. Por otra parte, para tipificar posibles casos relacionados. Este último aspecto cobra cierto interés casi exclusivamente para *M. bovis*. La RFLP de la IS6110 permite detectar las cepas de *M. bovis* y también las de *M. microti*. Asimismo, la técnica de *spoligotyping*, con un patrón característico con ausencia de hibridación en una determinada zona, también es útil para la detección de *M. bovis*. Las escasas cepas aisladas de *M. canettii* se han diferenciado del complejo con RFLP de la IS6110 y también de la IS1081. Estas dos secuencias de inserción también son útiles en la detección de *M. bovis* BCG.

Para la diferenciación de *M. bovis*, en el contexto del estudio de posibles casos relacionados, las técnicas PGRS y VNTR han resultado ser más resolutivas.

11.2.2. Micobacterias distintas al complejo *M. tuberculosis*. Entre ellas, se han aplicado sobre todo al complejo *M. avium*, especialmente a la especie *M. avium*, que es la que se aísla con mayor frecuencia. Se han utilizado diversas técnicas basadas en amplificación y restricción, usando la electroforesis de campo pulsante (PFGE) o RFLP basada en diferentes secuencias de inserción, como son la IS1245, IS1311, IS901, IS902 o IS1110. La técnica más utilizada es la RFLP de la IS1245. Su principal aplicación ha sido el análisis de diferentes aislamientos en el tiempo de un mismo paciente. En este aspecto la conclusión más evidente ha sido la persistencia de los mismos genotipos en un mismo paciente. También ha aportado cierta información en estudios dirigidos a detectar la fuente de contagio. Aunque este punto no está aclarado, se ha observado que los aislamientos de humanos son más parecidos a los hallados en cerdos que a los hallados en pájaros, posiblemente debido a que es más fácil compartir la fuente de contagio con aquellos.

Para la tipificación de *M. kansasii* se han utilizado diversas técnicas como la RFLP de la IS1652, PGRS, PFGE, así como diversos métodos basados en PCR, como la PCR-RFLP del gen *hsp65*.

También se han aplicado técnicas de tipificación a otras micobacterias como *M. xenopi*, con RFLP de las

secuencias IS1081 e IS1395, o *M. gordonae* con IS1511 e IS1512.

12. ESTRUCTURA, DOTACIÓN Y SEGURIDAD DEL LABORATORIO DE MICOBACTERIAS

12.1. NIVELES DE LOS LABORATORIOS DE MICOBACTERIOLOGÍA

Las distintas técnicas que pueden emplearse para el diagnóstico de las infecciones por micobacterias pueden considerarse de forma muy variable en cuanto a su complejidad, la necesidad de equipos especializados, el riesgo que supone la realización de dichas técnicas y la experiencia necesaria para la evaluación de las mismas. En función de todas estas variables, se han establecido diversos criterios para la clasificación de los laboratorios de micobacterias, de forma que las necesidades de equipamiento y la capacidad de los mismos pudiesen estar de acuerdo con las posibilidades diagnósticas que éstos pudiesen ofrecer. Así, en general pueden considerarse tres niveles de laboratorios:

Nivel 1. Serían los laboratorios capacitados para realizar *tinciones* de ácido-alcohol resistencia, así como la *recogida*, *almacenamiento* y *envío* de muestras para su cultivo a los laboratorios de nivel superior. El equipamiento en estos casos es sencillo, siendo imprescindible un microscopio y un banco de trabajo. La manipulación de las muestras para la realización de las tinciones se considera una actividad que no requiere estrictamente las normas de seguridad de nivel 3, como se describen posteriormente, si bien el carácter de transmisibilidad aérea de los microorganismos y la posibilidad de generar aerosoles durante el proceso, hace deseable que las extensiones se preparen dentro de una cabina de bioseguridad con capacidad para proteger al trabajador.

Nivel 2. Incluye los laboratorios que, además de realizar tinciones, tengan la capacidad de cultivar las muestras, llevar a cabo las identificaciones mediante sondas comerciales, además de realizar subcultivos, almacenarlos, y enviar los aislamientos a los laboratorios de nivel superior para ulteriores determinaciones. La realización de los procedimientos implicados exige un nivel 3 de seguridad biológica.

Nivel 3: En este nivel se encuentran un amplio grupo de laboratorios (que precisarían un nivel 3 de bioseguridad) en función de la capacidad de los mismos para identificar los aislamientos a nivel de especie mediante sistemas comerciales o "caseros", realizar estudios de sensibilidad frente a los fármacos de primera y/o segunda línea, detectar e identificar micobacterias directamente en las muestras clínicas mediante técnicas moleculares e incluso realizar estudios de epidemiología molecular, tanto de *M. tuberculosis* como del resto de especies. Dentro de esta amplia variedad de capacidades, podrían pertenecer al nivel 3 (en su estrato más básico) aquellos laboratorios capaces de realizar tinciones,

cultivos, identificación de la mayoría de los aislamientos mediante técnicas comerciales (sondas fundamentalmente) y realización de estudios de sensibilidad de *M. tuberculosis* a los fármacos de primera línea mediante técnicas comerciales. En el otro extremo del nivel 3 (el estrato más alto) se encontrarían los laboratorios de referencia con capacidad de realizar todas las técnicas anteriormente descritas, poder disponer de un cepario en condiciones de seguridad y desarrollar y aplicar otras posibles técnicas que pudiesen aparecer. La posibilidad para un laboratorio de realizar unas técnicas u otras va a depender de las *disponibilidades logísticas* (necesidad de instalaciones adecuadas, personal suficiente, etc.), de la *experiencia* en la realización de las mismas y del *coste-eficacia* de los diferentes métodos, que vendría dado por el número de aislamientos, tasas de resistencia, importancia numérica de los aislamientos de micobacterias no tuberculosas, etc. Es importante, en ese sentido, utilizar el sentido común a la hora de decidir el implantar una nueva técnica o derivarla a un laboratorio de referencia. Al final, la prioridad absoluta debería ser la capacidad de obtener resultados correctos y fiables que permitan el manejo más adecuado de los pacientes.

12.2. BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBACTERIAS

12.2.1. Niveles de bioseguridad. Dentro de las distintas clasificaciones de los microorganismos en función del riesgo biológico que representan, el complejo *M. tuberculosis*, *M. leprae* y *M. ulcerans* figuran como organismos del nivel III, incluida la clasificación existente en la legislación española (R.D. 664/97) y europea (Directiva 2000/54/CE). Los microorganismos de nivel III se definen como aquellos que pueden causar una enfermedad grave en el hombre y presentan un serio peligro para los trabajadores, con riesgo de que se propaguen a la colectividad y existiendo generalmente una profilaxis o tratamiento eficaz. Sin embargo, a pesar de esta clasificación, no es imprescindible que todas las manipulaciones necesarias para el diagnóstico de tuberculosis se realicen bajo las condiciones exigidas para el nivel III de bioseguridad. Más específicamente, la realización de las extensiones para tinciones de ácido-alcohol resistencia pueden llevarse a cabo en condiciones de nivel II de seguridad, si bien es prudente que se realicen dentro de una cabina de seguridad biológica.

Dentro de las medidas a aplicar en caso de manejar microorganismos de nivel III, se encuentra una amplia variedad de ellas que se pueden agrupar en dos grandes apartados: infraestructuras y prácticas de laboratorio a tomar por parte del personal. La obligatoriedad o no de llevarlas a cabo dependerá en buena medida del manual o la legislación que se siga, aunque en la inmensa mayoría de los casos todas las

recomendaciones coinciden en los aspectos fundamentales.

12.2.2. Infraestructuras. Dentro de las infraestructuras, el *diseño del laboratorio* juega un papel fundamental, dado que tiene que cumplir con determinados requerimientos específicos. Se recomienda que el laboratorio esté separado del resto mediante un sistema de *doble puerta*. La ventilación del laboratorio es un tema particularmente importante, teniendo en cuenta la transmisibilidad aérea de las micobacterias de nivel III que habitualmente se manejan en los laboratorios asistenciales. En ese sentido, debe existir un sistema de regulación del flujo de aire que evite la salida de corrientes desde el laboratorio de seguridad hacia el resto de las instalaciones, mediante el mantenimiento de una presión atmosférica inferior a la existente en el exterior del mismo (*presión negativa*). Este sistema se considera de crucial importancia, si bien la legislación vigente en nuestro país sólo lo considera aconsejable (aunque el desarrollo de la ley en la *Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos* del INSHT sí lo considera necesario). Dado el consenso casi generalizado sobre el tema, todo aquel laboratorio que trabaje con cultivos del complejo *M. tuberculosis* deberá tener dicha presión negativa, y más cuando existe el riesgo de trabajar con cepas resistentes. Por otra parte, la legislación sí que obliga a que todo el aire que salga de las instalaciones de seguridad biológica debe pasar a través de filtros HEPA, medida indudablemente complementaria a la anterior.

Otro aspecto es la necesidad de *cabinas de seguridad biológica*, en el interior de las cuales se realizará toda la manipulación de muestras y cultivos. Existen distintos modelos, si bien en el caso del laboratorio de nivel III es necesario disponer de cabinas de clase II o incluso III. Estas cabinas están diseñadas para proteger tanto los cultivos como a los trabajadores. Otro material necesario son las *centrífugas* con sistemas de protección frente a accidentes o roturas, así como un *autoclave* para esterilizar material independientemente del resto.

12.2.3. Prácticas de laboratorio. Dentro de las prácticas de laboratorio, además de las recomendadas en todos los niveles de bioseguridad, en el laboratorio de micobacterias serán necesarias medidas específicas. El empleo de diversas *ropas protectoras* es una de las medidas de seguridad fundamentales, recomendándose el empleo de batas impermeables de cierre trasero y guantes (no necesariamente estériles). Todo este equipo debe permanecer en el interior del laboratorio de nivel III y no debe usarse en el exterior del mismo. Aquellas prendas que sean reutilizables deberán ser desinfectadas antes de ser enviadas a la lavandería.

Además del empleo de estas prendas, se recomienda el lavado de manos frecuente en lavabos accionados con pedal o con el codo.

Otro de los elementos fundamentales es el empleo de *protección respiratoria* siempre que se realice alguna actividad con muestras o cultivos. Aunque alguna guía considera dicha protección necesaria sólo cuando se trabaje fuera de la cabina de seguridad biológica, el riesgo de accidentes que comprometan la capacidad protectora de las mismas hacen recomendable el empleo de dicha protección incluso cuando se trabaje dentro de la cabina. Esta protección deberá ser llevada a cabo mediante el empleo de respiradores de seguridad N95, no siendo deseable el empleo de mascarillas quirúrgicas, salvo en caso de extrema necesidad.

12.2.4. Controles del personal. Junto con las medidas anteriormente referidas correspondientes a los niveles II y III, se recomienda la realización periódica de pruebas tuberculínicas (PPD) en el personal del laboratorio en general, y en el del laboratorio de micobacterias en particular. Este procedimiento deberá repetirse anualmente en todos aquellos profesionales mientras el resultado de la misma sea negativo. Debería además llevarse a cabo una prueba Booster al inicio de los controles en el personal de nueva incorporación que resultase negativo. Si ocurriese un accidente con exposición del trabajador a inóculos elevados, todos aquellos trabajadores expuestos y que sean tuberculina (PPD) negativos deberán estudiarse en el momento del accidente y, si continuasen siendo negativos, a los 2-3 meses del mismo, para evaluar la posible existencia de conversiones. En aquellos trabajadores infectados se recomendará el tratamiento de la infección tuberculosa latente de acuerdo con las pautas existentes para el resto de la población. No se recomienda en el momento actual la vacunación sistemática con BCG.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Barnes, P.F, and M.D. Cave. 2003. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 349:1149-1156.
2. Brown Elliot, B.A., and R.J. Wallace, Jr. 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:716-746.
3. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. Chapin, K.C., and T.L. Lauderdale. 2003. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. *In:* P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
5. Chapin, K.C., and P.R. Murray. 2003. Principles of Stains and Media. *In:* P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
6. Devallois, A, K.S. Goh, and N. Rastogi. 1997. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* 35:2969-2973.
7. Directiva 2000/54/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de septiembre de 2000 sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. 2000. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas.* 262: 21-45.
8. Enarson, D.A., H.L. Rieder, T. Arnadottir, and A. Trébuq. 2000. Technical Guide: Sputum Examination for Tuberculosis by Direct Microscopy in Low Income Countries. *Management of Tuberculosis*, 5th ed. Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), Paris, France.
9. Heifets, L. B. 1991. Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infection. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
10. Inderlied, C.B., and G.E. Pfyffer. 2003. Susceptibility Test Methods: Mycobacteria, p. 1149-1177. *In:* P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenenbaum (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
11. Inderlied, C. B., and K. A. Nash. 1996. Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing, spectra of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biologic fluids, p. 127-175. *In:* V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine.* 4th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
12. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. 1997. Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos.
13. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, and W.C. Winn. 1997. *Mycobacteries. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA.
14. Kubica, G.P., E. Dye, M.L. Cohn, and G. Middlebrook. 1966. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodiumhydroxide for culture of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 87:775-779.
15. Lévy-Frédault, V.V., and F. Portaels. 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:315-323.
16. Master, R.N. 1995. Mycobacteriology p. 3.0.1-3.16.4. *In:* H.D. Isenberg (ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.
17. Miller, J.L. 1996. A guide to specimen management in clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
18. Mycolic Acid Pattern Standards for HPLC Identification of Mycobacteria. 1999. HPLC Users Group. US Department of Health and Human Services.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; Approved Standard. Document M24-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

20. Orden de 25 de marzo de 1998 por la que se adapta en función del progreso técnico el Real Decreto 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. 1998. Boletín Oficial del Estado.
21. Pfyffer, G.E., B.A. Brown-Elliott, and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures, p. 532-559. *In*: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
22. Prod'homme, G., V. Vincent, G.E. Pfyffer, and A. Telenti. PRASITE: Identification of Mycobacteria. Web page : <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>
23. Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Boletín Oficial del Estado. 1997.
24. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01). SEIMC, 2003. En: <http://www.seimc.org/>
25. RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms). Web page: <http://www.ridom-rdna.de>
26. Richmond J.Y., and R.W. McKinney. eds. Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina. 4ª edición. 2002. CDC-NIH. Atlanta.
27. Runyon EH. 1970. Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. *Am. J. Clin. Path.* 54:578-586.
28. Standardized Method for HPLC Identification of Mycobacteria. 1996. HPLC Users Group. US Department of Health and Human Services.
29. Van Embden, J.D.A., M.D. Cave, J.T. Crawford, J.W. Dale, K.D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martín, R. McAdam, T.M. Shinnick, and P.H. Small. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 31:406-409.
30. Vincent, V., B.A. Brown-Elliott, K.C. Jost Jr., and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: Phenotypic and Genotypic Identification, p. 560-584. *In*: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
31. WHO. Laboratory Biosafety Manual. 2nd edition. Interim Guidelines. 2003. WHO. Ginebra.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Tinción de Ziehl-Neelsen	PNT-BK-01	
		Edición Nº 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es definir la metodología de la tinción Ziehl-Neelsen para la observación directa de los bacilos ácido-alcohol resistentes.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que posean la dotación y experiencia adecuada para el manejo de estos microorganismos.

2. FUNDAMENTO

Las micobacterias son difíciles de teñir debido a la gran dotación lipídica (ácidos micólicos) de su pared, que las hace impermeables a los colorantes habituales. Por ello, las tinciones utilizadas, como la de Ziehl-Neelsen, se basan en el hecho de su ácido-alcohol resistencia que, entre otras características, se manifiesta por la capacidad que tienen estas bacterias de retener un colorante básico, como determinados arilmetanos (fucsina), tras la acción de un decolorante ácido-alcohol. Para que estas bacterias puedan contrastar se utiliza un contracolorante (azul de metileno) que teñirá el resto de la preparación. No todas las estructuras ácido-alcohol resistentes son micobacterias. Existen otros microorganismos que pueden presentar grados diferentes de ácido-alcohol resistencia como son especies de *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordona*, *Legionella* (*L. micdadei*), y los ooquistes de *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Sarcocystis* y *Cyclospora*. Sin embargo, la especificidad del examen directo de la muestra para determinar el género es bastante elevada, pero la diferenciación a nivel de especie suele ser casi imposible.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica (Procedimiento 10). Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC, 2000.

Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01). SEIMC, 2003.

Procedimientos específicos para cada tipo de técnica.

4. MUESTRAS

Esta técnica debe aplicarse sistemáticamente sobre cualquier muestra clínica (pretratada o no) o microorganismo obtenido por cultivo en el que sea preciso descartar estos patógenos, con la excepción de la sangre.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Fucsina fenicada (colorante primario: 3 g fucsina básica, 50 ml fenol y 100 ml etanol 95%).
- Solución 1: 3 g de fucsina en 100 ml de etanol al 95%; Solución 2: 5 g de fenol (cristales) en 100 ml de agua destilada; Solución de trabajo: 10 ml de la solución 1 con 90 ml de la solución 2.
- Azul de metileno (contracolorante: 3 g azul de metileno y 1.000 ml agua destilada).

NOTA: Para la preparación de los reactivos deben seguirse las instrucciones específicas de preparación, control, conservación, etc., consignadas en los procedimientos de preparación de medios y reactivos correspondientes.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de Seguridad Biológica de clase IIA o IIB3.
- Calentador de portaobjetos.
- Vórtex.
- Microondas (opcional).
- Microscopio de luz visible provisto de un objetivo 100 x.
- Portaobjetos. Las láminas de cristal deben ser nuevas con un espesor ≤ 1 mm.
- Asa bacteriológica estéril.
- Pipetas Pasteur de plástico estériles.

7. PROCESAMIENTO

7.1. EXTENSIONES

Siempre se realizarán en una Cabina de Seguridad Biológica. Tras marcar en un extremo del portaobjeto el número de registro de la muestra a estudiar, se procederá de la siguiente forma:

- Para las extensiones directas, seleccionar la parte más purulenta de la muestra. Con un asa bacteriológica estéril se cogerá una porción significativa de la misma y se extenderá sobre el portataobjetos (aproximadamente 1,5 cm de ancho x 3 cm de largo)
- Para las muestras pre-tratadas y concentradas por centrifugación, se homogeneizará el sedimento con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico y se transferirá una gota al portaobjetos que se extenderá como se ha mencionado previamente.
- No deberá preparar más de una extensión por portaobjetos.
- Fijar el material al portaobjetos mediante un calentador eléctrico (60 a 90°C) o bien dejándolo secar al aire.

NOTA: La fijación mediante calor puede mantener la viabilidad de algunas micobacterias. Por ello, estas preparaciones deberían manejarse con extremo cuidado.

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

- Agitar el sedimento del LCR centrifugado antes de preparar las extensiones.
- Con una pipeta Pasteur transferir una gota de la muestra al porta sin extenderla.
- Dejar secar la gota.
- Repetir el proceso dos veces más, añadiendo una nueva gota encima de la anterior.

7.2. TÉCNICA DE TINCIÓN

- Colocar los portaobjetos sobre el soporte de tinción dejando suficiente espacio entre ellos para

Servicio de Microbiología Hospital.....	Tinción de Ziehl-Neelsen	PNT-BK-01	
		Edición Nº 01	Página 3 de 4

evitar arrastres y transferencias entre muestras diferentes.

- Cubrir la preparación totalmente con la solución de fucsina filtrada.
- Calentar suavemente el portaobjetos flameando varias veces (por ej., 3) la preparación hasta la emisión de vapores (aproximadamente 10 segundos), evitando la desecación y la ebullición. Esperar 5 minutos.
- Alternativamente el paso anterior se puede realizar calentando la preparación en un microondas a la intensidad mínima durante 1-2 min evitando la ebullición.
- Lavar con agua (preferiblemente destilada en muestras estériles) y decantar la preparación.
- Añadir el alcohol-clorhídrico (decolorante) y mantener durante 2 min.
- Lavar con agua y decantar.
- Añadir el azul de metileno dejándolo durante 3 minutos.
- Lavar con agua y dejar secar a temperatura ambiente.

7.3. LECTURA

- Examinar en un microscopio (luz visible) con un objetivo de inmersión (x 100) con aceite.
- Se debe examinar un mínimo de 300 campos antes de dar una tinción como negativa.
- Se procurará seguir un orden dentro del portaobjetos (izquierda a derecha, zig-zag, etc.) iniciando la observación por un extremo del mismo.
- Los bacilos ácido-alcohol resistentes se teñirán en rojo brillante sobre un fondo azulado. Estos tienen aproximadamente de 1 a 10 µm de longitud y de 0,2 a 0,6 µm de ancho, pueden estar ligeramente curvados y no suelen teñirse de manera uniforme adoptando un aspecto de granulado a lo largo del cuerpo bacteriano. La morfología varía ligeramente de unas especies micobacterianas a otras, lo que ha llevado a intentar hacer un diagnóstico de especies a partir de las características microscópicas. Sin embargo esta tarea resulta muy arriesgada y poco recomendable aun en el caso de personal entrenado y con experiencia. En medio de cultivo líquido, *Mycobacterium tuberculosis* exhibe a menudo un aspecto de cuerdas serpenteantes, pero también ocurre con algunas micobacterias no tuberculosas (MNT). Las MNT pueden aparecer con aspecto pleomórfico, con formas cocoides, formando filamentos o teñidas uniformemente. *M. kansasii* suele ser de mayor tamaño que otras micobacterias y se tiñe irregularmente con un aspecto de bandas cruzadas o granulaciones a lo largo del cuerpo bacteriano, que le dan un aspecto arrosariado o "atigrado". Pueden existir formas cocáceas, muy frecuentes en aquellos individuos sometidos a tratamiento antituberculoso.

7.4. CONTROL DE CALIDAD

- En cada lote de reactivos nuevo se deberá comprobar su capacidad de tinción de los bacilos ácido-alcohol resistentes.
- Se prepararán suspensiones con un 1 ml de suero fisiológico o agua destilada de una turbidez 1 McFarland de *Escherichia coli* (control negativo) y *Mycobacterium kansasii* (control positivo). No se deberán utilizar micobacterias de crecimiento rápido.
- Las extensiones y tinciones se realizarán igual que en cualquier muestra clínica.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- **Negativo:** Cuando no se visualiza bacilo alguno en toda la preparación. Se informará: "No se observan bacilos ácido-alcohol resistentes".
- **Positivo:** Cuando se visualiza uno o más bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).
 - De 1 a 2 BAAR en toda la extensión (300 campos) no se informará. Realizar una nueva extensión y tinción o solicitar una nueva muestra.
 - De 1 a 9 BAAR en 100 campos, se informará: BAAR +.
 - De 1 a 9 BAAR en 10 campos, el informe será: BAAR ++.
 - De 1 a 9 BAAR por campo, el informe será: BAAR+++.
 - > 9 BAAR por campo, deberá informarse: BAAR++++.
- Los resultados obtenidos se registrarán en los impresos para tal efecto, así como en la base de datos del programa de gestión del laboratorio. Tanto los resultados a nivel informático como los que precisen ser informados por papel deberán ser revisados y validados por el facultativo responsable.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

La extensión de la muestra, tinción y lectura deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. En el caso especial de las micobacterias deberán seguirse las normas básicas de protección frente a los agentes biológicos del grupo 3 y recordar que la fijación mediante calor puede permitir la viabilidad de algunas micobacterias.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Tinción de Ziehl-Neelsen	PNT-BK-01	
		Edición Nº 01	Página 4 de 4

Por ello, las extensiones no teñidas deberían manejarse con extremo cuidado, en particular cuando se realizan a partir de cultivos micobacterianos.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones más importantes vienen derivadas de los errores en la observación microscópica. Estos pueden ser errores por defecto o por exceso.

11.1 ERRORES POR DEFECTO (FALSOS NEGATIVOS)

- El estudio de muestras no representativas: moco nasal y/o saliva en vez de esputo, poca cantidad de orina, jugo gástrico no tamponado, etc.
- Extensiones demasiado gruesas o finas.
- Mala fijación de la extensión.
- Mala calidad de los colorantes.
- Mala realización de la técnica. Sobre todo un exceso de decoloración.
- Defecto de observación: pocos campos examinados, fatiga del observador, escasa atención o experiencia, etc.
- Muestras paucibacilares (< 10.000 micobacterias/ml).

11.2 ERRORES POR EXCESO (FALSOS POSITIVOS)

Son los más graves y pueden deberse a:

- Restos de comida o partículas (fibras de tejidos, polen, etc.) en el esputo.
- Presencia de precipitados del colorante, sobre todo cuando la solución de fucsina no está filtrada y es vieja.
- Descontaminación enérgica de las muestras en el laboratorio.
- Incubación corta de los cultivos.
- Contaminación cruzada de los portaobjetos durante las tinciones y/o uso de agua contaminada con micobacterias saprófitas.
- Contaminación a través del aceite mineral con los objetivos de inmersión (debe limpiarse el objetivo con cada preparación) o con el dispensador de aceite (no tocar las preparaciones al poner el aceite).
- Contaminación de los materiales o reactivos empleados para la obtención o el procesamiento de la muestra.
- Presencia de otros microorganismos ácido-alcohol resistentes.
- Un caso especial son los pacientes en tratamiento antimicobacteriano. En realidad no sería un falso positivo, ya que los bacilos son observables pero no serían viables y, por tanto, no recuperables por el cultivo.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Chapin, K.C., and T.L. Lauderdale. 2003. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. *In*: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
3. Chapin, K.C., and P.R. Murray. 2003. Principles of Stains and Media. *In*: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
4. Enarson, D.A., H.L. Rieder, T. Arnadottir, A. Trébuq. 2000. Technical Guide: Sputum Examination for Tuberculosis by Direct Microscopy in Low Income Countries. Management of Tuberculosis, 5th ed. Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), Paris, France.
5. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, W.C. Winn. 1997. Mycobacteries. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA..
6. Master, R. N. 1995. Mycobacteriology. *In*: H. D. Isenberg (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.
7. Miller, J.L. 1996. A guide to specimen management in clinical microbiology. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
8. Pfyffer, G. E., B. A. Brown-Elliott, R. J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures. *In*: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, R. H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Digestión y descontaminación con N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sodio	PNT-BK-02	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es definir la metodología para la realización del pretratamiento (descontaminación y digestión) de las muestras clínicas no estériles antes de proceder a su inoculación en los medios de cultivo para micobacterias. Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que posean la dotación adecuada para el manejo de estos microorganismos.

2. FUNDAMENTO

La mayor parte de las muestras clínicas (esputos, orinas, etc.) están contaminadas con una flora bacteriana mixta que tiene un poder de multiplicación más rápido que las micobacterias. En principio, un procedimiento de *descontaminación* debería ser capaz de eliminar, en la medida de lo posible, los contaminantes sin afectar seriamente la viabilidad de las micobacterias. La *digestión* permite la homogeneización de la muestra ya que algunas (en particular los esputos) contienen moco que, si no es licuado, proporciona a las bacterias contaminantes una barrera de protección frente a la acción del agente descontaminante. Uno de los métodos de descontaminación-digestión más utilizados (Kubica y cols.) combina el hidróxido sódico (agente descontaminante) con la *N*-acetil-*L*-cisteína (agente mucolítico). Este tipo de pretratamiento es compatible con los medios de cultivo más habituales tanto sólidos como líquidos, incluidos los nuevos sistemas de detección automatizados.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica (Procedimiento 10). Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC, 2000.

Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01). SEIMC, 2003.

Procedimientos específicos mencionados en la bibliografía (punto 12).

4. MUESTRAS

Cualquier muestra clínica que presuntamente contenga una flora bacteriana inespecífica. Los líquidos orgánicos estériles y los tejidos recogidos asépticamente no lo precisan. Si existen dudas podría optarse por refrigerar la muestra 24 horas hasta disponer del resultado preliminar de los cultivos rutinarios de esa muestra clínica.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Solución de NaOH-citrato sódico (resultado de la mezcla a partes iguales de una solución de NaOH al 4% 1N y de una solución de citrato sódico dihidratado -29 g en 1.000 ml de agua destilada- la mezcla se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min y se conserva refrigerada).

N-acetil-*L*-cisteína (NALC). Se añadirá a la mezcla anterior, justo en el momento de utilizarse, en una proporción de 0,5 g por cada 100 ml.

Solución tampón fosfato 0,067 M (pH= 6,8 ± 0,2).

6. APARATOS Y MATERIALES

Cabina de seguridad biológica de clase IIA o IIB3. Centrífuga con sistema de cierre de seguridad.

Vórtex.

Agitador.

Tubos de centrifuga estériles de fondo cónico de 50 ml de capacidad con tapas de cierre hermético.

Asas bacteriológicas estériles.

Pipetas Pasteur.

7. PROCESAMIENTO

7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

Preparar cada día la Solución Descontaminante de Trabajo. Para ello se combina la solución de NaOH-citrato de sodio con la NALC. Una vez preparada esta solución puede utilizarse durante toda la jornada laboral.

Añadir en un tubo estéril de fondo cónico (50 ml) un volumen de la solución de trabajo igual al de la muestra. Si el volumen de la muestra es superior a 10-15 ml seleccionar esta cantidad, a ser posible, de la parte más purulenta.

Agitar la mezcla en un vórtex durante un tiempo no superior a 30 seg. Invertir el tubo para que la solución entre en contacto con la muestra.

Dejar el tubo en un agitador a temperatura ambiente durante 15 min (máximo de 20 min) para descontaminar la muestra.

Diluir la mezcla hasta 50 ml con solución tampón fosfato 0,067 M.

Tapar el tubo e invertirlo para que se mezcle bien.

Centrifugar a 3.000 x g durante 15-20 min.

Desechar el sobrenadante.

Suspender el sedimento en 2 ml de agua destilada o tampón fosfato.

Usar esta solución para preparar la extensión y sembrar los medios de cultivo.

7.2. CONTROL DE CALIDAD

Cuando se utilicen reactivos de fabricación propia, en cada lote se debería comprobar que el pH es el adecuado de acuerdo a la descripción del método y que presentan un aspecto macroscópico adecuado.

Se efectuará un *control de esterilidad* de las soluciones de descontaminación y neutralización sembrando una placa de agar sangre o chocolate de cada lote e incubando a 35-37°C durante 5 días. El control de esterilidad no deberá presentar crecimiento.

Antes de su uso se debería comprobar que las soluciones de descontaminación y neutralización presentan las características macroscópicas adecuadas de estabilidad y esterilidad.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Digestión y descontaminación con N-acetil- L-cisteína e hidróxido de sodio	PNT-BK-02	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

La *eficacia del proceso de descontaminación* se puede efectuar monitorizando el porcentaje de muestras contaminadas entre las que recibieron el pretratamiento. Es recomendable realizar evaluaciones con una determinada periodicidad. En general se admite que el procedimiento es óptimo cuando el porcentaje de contaminaciones es del orden del 3 al 5%. No obstante, debido a los múltiples factores que condicionan la presencia de contaminaciones, estos márgenes deberían ser únicamente orientativos.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos (cultivos contaminados) se registrarán en los impresos para tal efecto, así como en la base de datos del programa de gestión del laboratorio.

Tanto los resultados a nivel informático como los que precisen ser informados por papel deberán ser revisados y validados por el facultativo responsable.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. En el caso de las micobacterias deberán seguirse las normas básicas de protección frente a los agentes biológicos del grupo 3.

En la técnica de digestión y descontaminación descrita existen unos puntos críticos a tener en cuenta:

Evitar una agitación excesiva de la solución NALC-NaOH, ya que la *N-acetil-L-cisteína* es inestable en presencia de oxígeno.

La descontaminación, es decir, el contacto entre la muestra y el descontaminante (NaOH), NUNCA deberá superar los 20 min.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones vienen derivadas del difícil equilibrio entre la capacidad de eliminación de la flora acompañante por las soluciones descontaminantes y el posible excesivo daño que estas puedan realizar a los bacilos micobacterianos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Chapin, K.C., and T.L. Lauderdale. 2003. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. In: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
3. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, W.C. Winn. 1997. Mycobacteries. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA..
4. Kubica, G.P., E. Dye, M.L. Cohn, and G. Middlebrook. 1966. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodiumhydroxide for culture of mycobacteria. Am. Rev. Respir. Dis. 87:775-779.
5. Murray, R.N. 1995. Mycobacteriology p. 3.0.1-3.16.4. In: H.D. Isenberg (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.
6. Miller, J.L. 1996. A guide to specimen management in clinical microbiology. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
7. Pfyffer, G.E., B.A. Brown-Elliott, and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures, p. 532-559. In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenenbaum (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Cultivo de micobacterias en medio sólido de Löwenstein-Jensen	PNT-BK-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para el aislamiento de micobacterias a partir de muestras clínicas mediante el cultivo en medio sólido de Löwenstein-Jensen.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que posean la dotación y experiencia adecuada para el manejo de estos microorganismos.

2. FUNDAMENTO

Las micobacterias son muy resistentes a la acción de los agentes físicos y químicos, pero al mismo tiempo son muy exigentes desde el punto de vista nutricional. Actualmente se recomienda utilizar un medio de cultivo sólido y uno líquido. El medio sólido de Löwenstein-Jensen es un medio a base de huevo, fécula de patata, glicerol y sales, solidificado por calentamiento de 85° a 95°C durante 30-45 min. Además de que la mayoría de las micobacterias crecen bien en Löwenstein-Jensen, este medio tiene las ventajas de reducir el crecimiento de otros microorganismos, al contener verde de malaquita, y resistir bien la desecación durante bastante tiempo (caducidad de un año).

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica (Procedimiento 10). Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC, 2000.

Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01). SEIMC, 2003.

Procedimientos específicos mencionados en la bibliografía (punto 12).

4. MUESTRAS

Cualquier muestra clínica que presuntamente contenga micobacterias.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Medio de Löwenstein-Jensen en tubos de vidrio con tapón de rosca.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica de clase IIA o IIB3.
- Vórtex.
- Incubador de CO₂.
- Agujas y jeringuillas de 1 ml o pipetas tipo Pasteur calibradas.
- Gradillas verticales e inclinadas para tubos.

7. PROCESAMIENTO

7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

- Retirar el posible líquido de condensación de los tubos de Löwenstein-Jensen.
- Etiquetar o rotular los tubos correctamente.
- Inocular la muestra una vez terminado el proceso de descontaminación. Se realizará con una jeringuilla de 1 ml o pipeta Pasteur calibrada, dispensando 0,5 ml en cada medio de cultivo.

- Incubar los tubos en un incubador a 35-37°C y en una atmósfera de un 5-10% de CO₂ al menos durante los primeros 7-15 días.
- Los tubos de Löwenstein-Jensen deberán permanecer inclinados hacia arriba en gradillas específicas, para que la muestra esté en contacto con la mayor parte de la superficie del medio. Los tapones de los tubos no deben estar totalmente cerrados para que haya intercambio aéreo y se evapore todo el líquido. Cuando la superficie del medio esté completamente seca (10-15 días aproximadamente) los tapones se deberán cerrar y los tubos se dispondrán en gradillas de manera vertical en un incubador sin CO₂.
- En muestras de procedencia cutánea se deberán sembrar dos tubos, incubando uno a 37°C y el otro a 30°C.
- Todos los cultivos deberán incubarse durante un mínimo de 6 semanas, antes de considerarlos negativos.

7.2. CONTROL DE CALIDAD

- Cada día, se deberá examinar el color, la presencia de deshidratación (medios sólidos) y la fecha de caducidad de los medios a utilizar.
- Para el control de *esterilidad* se debería incubar a 35-37°C durante 5 días una placa o tubo del medio de cada nuevo lote que se inicie. En este control no se deberá observar crecimiento en el medio.
- El control del *rendimiento* o *eficiencia* del medio se deberá realizar en cada nuevo lote fabricado en el laboratorio. Para ello se pueden realizar suspensiones en suero fisiológico o agua destilada de una turbidez 0,5 McFarland de *M. tuberculosis*, *M. avium* y *Escherichia coli*. Se inocularán entre 10-50 µl de cada suspensión en los medios a probar y se procederá a su incubación a 35-37°C en 5-10% de CO₂ durante 21 días. En este control se deberá constatar el crecimiento de *M. tuberculosis* y *M. avium*, pero una inhibición parcial o completa de *E. coli*.
- Los resultados deberán registrarse. Cuando estos no sean correctos se deberían llevar a cabo nuevos controles. Las medidas correctivas podrían incluir la realización de nuevas pruebas adicionales que determinen el problema del medio o la notificación al fabricante para el reemplazo completo del lote. En los medios fabricados en el laboratorio habría que revisar el procedimiento de preparación y los reactivos utilizados.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Los tubos de Löwestein-Jensen deben ser examinados con buena luz y detenimiento, al menos, una vez por semana, para detectar la presencia de colonias indicativas de crecimiento.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Cultivo de micobacterias en medio sólido de Löwenstein-Jensen	PNT-BK-03	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

- De cualquier crecimiento se deberá realizar una tinción de Ziehl-Neelsen, comprobando si se trata de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) y/o de un contaminante (bacteriano o fúngico).
- Los resultados obtenidos (cultivos positivos para BAAR o negativos tras 6 semanas) se registrarán en los impresos para tal efecto, así como en la base de datos del programa de gestión del laboratorio. Tanto los resultados a nivel informático como los que precisen ser informados por papel deberán ser revisados y validados por el facultativo responsable.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. En el caso de las micobacterias deberán seguirse las normas básicas de protección frente a los agentes biológicos del grupo 3. Por ello, todos los pasos de la técnica se deben realizar en una cabina de seguridad biológica clase IIA o IIB3, utilizando bata, guantes y mascarilla de uso exclusivo.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones vienen derivadas de la representatividad y calidad de la muestra, así como del pretratamiento de la misma (descontaminación), y la capacidad del medio para la recuperación de la especie micobacteriana concreta.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Chapin, K.C., and T.L. Lauderdale. 2003. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. In: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
3. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, W.C. Winn. 1997. Mycobacteriology. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA..
4. Murray, R.N. 1995. Mycobacteriology p. 3.0.1-3.16.4. In: H.D. Isenberg (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.
5. Pfyffer, G.E., B.A. Brown-Elliott, and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures, p. 532-559. In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Cultivo de micobacterias en medio sólido de Löwenstein-Jensen	PNT-BK-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para el aislamiento de micobacterias a partir de muestras clínicas mediante el cultivo en medio sólido de Löwenstein-Jensen.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que posean la dotación y experiencia adecuada para el manejo de estos microorganismos.

2. FUNDAMENTO

Las micobacterias son muy resistentes a la acción de los agentes físicos y químicos, pero al mismo tiempo son muy exigentes desde el punto de vista nutricional. Actualmente se recomienda utilizar un medio de cultivo sólido y uno líquido. El medio sólido de Löwenstein-Jensen es un medio a base de huevo, fécula de patata, glicerol y sales, solidificado por calentamiento de 85° a 95°C durante 30-45 min. Además de que la mayoría de las micobacterias crecen bien en Löwenstein-Jensen, este medio tiene las ventajas de reducir el crecimiento de otros microorganismos, al contener verde de malaquita, y resistir bien la desecación durante bastante tiempo (caducidad de un año).

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica (Procedimiento 10). Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC, 2000.

Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01). SEIMC, 2003.

Procedimientos específicos mencionados en la bibliografía (punto 12).

4. MUESTRAS

Cualquier muestra clínica que presuntamente contenga micobacterias.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Medio de Löwenstein-Jensen en tubos de vidrio con tapón de rosca.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica de clase IIA o IIB3.
- Vórtex.
- Incubador de CO₂.
- Agujas y jeringuillas de 1 ml o pipetas tipo Pasteur calibradas.
- Gradillas verticales e inclinadas para tubos.

7. PROCESAMIENTO

7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

- Retirar el posible líquido de condensación de los tubos de Löwenstein-Jensen.
- Etiquetar o rotular los tubos correctamente.
- Inocular la muestra una vez terminado el proceso de descontaminación. Se realizará con una jeringuilla de 1 ml o pipeta Pasteur calibrada, dispensando 0,5 ml en cada medio de cultivo.

- Incubar los tubos en un incubador a 35-37°C y en una atmósfera de un 5-10% de CO₂ al menos durante los primeros 7-15 días.
- Los tubos de Löwenstein-Jensen deberán permanecer inclinados hacia arriba en gradillas específicas, para que la muestra esté en contacto con la mayor parte de la superficie del medio. Los tapones de los tubos no deben estar totalmente cerrados para que haya intercambio aéreo y se evapore todo el líquido. Cuando la superficie del medio esté completamente seca (10-15 días aproximadamente) los tapones se deberán cerrar y los tubos se dispondrán en gradillas de manera vertical en un incubador sin CO₂.
- En muestras de procedencia cutánea se deberán sembrar dos tubos, incubando uno a 37°C y el otro a 30°C.
- Todos los cultivos deberán incubarse durante un mínimo de 6 semanas, antes de considerarlos negativos.

7.2. CONTROL DE CALIDAD

- Cada día, se deberá examinar el color, la presencia de deshidratación (medios sólidos) y la fecha de caducidad de los medios a utilizar.
- Para el control de *esterilidad* se debería incubar a 35-37°C durante 5 días una placa o tubo del medio de cada nuevo lote que se inicie. En este control no se deberá observar crecimiento en el medio.
- El control del *rendimiento* o *eficiencia* del medio se deberá realizar en cada nuevo lote fabricado en el laboratorio. Para ello se pueden realizar suspensiones en suero fisiológico o agua destilada de una turbidez 0,5 McFarland de *M. tuberculosis*, *M. avium* y *Escherichia coli*. Se inocularán entre 10-50 µl de cada suspensión en los medios a probar y se procederá a su incubación a 35-37°C en 5-10% de CO₂ durante 21 días. En este control se deberá constatar el crecimiento de *M. tuberculosis* y *M. avium*, pero una inhibición parcial o completa de *E. coli*.
- Los resultados deberán registrarse. Cuando estos no sean correctos se deberían llevar a cabo nuevos controles. Las medidas correctivas podrían incluir la realización de nuevas pruebas adicionales que determinen el problema del medio o la notificación al fabricante para el reemplazo completo del lote. En los medios fabricados en el laboratorio habría que revisar el procedimiento de preparación y los reactivos utilizados.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Los tubos de Löwestein-Jensen deben ser examinados con buena luz y detenimiento, al menos, una vez por semana, para detectar la presencia de colonias indicativas de crecimiento.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Cultivo de micobacterias en medio sólido de Löwenstein-Jensen	PNT-BK-03	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

- De cualquier crecimiento se deberá realizar una tinción de Ziehl-Neelsen, comprobando si se trata de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) y/o de un contaminante (bacteriano o fúngico).
- Los resultados obtenidos (cultivos positivos para BAAR o negativos tras 6 semanas) se registrarán en los impresos para tal efecto, así como en la base de datos del programa de gestión del laboratorio. Tanto los resultados a nivel informático como los que precisen ser informados por papel deberán ser revisados y validados por el facultativo responsable.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. En el caso de las micobacterias deberán seguirse las normas básicas de protección frente a los agentes biológicos del grupo 3. Por ello, todos los pasos de la técnica se deben realizar en una cabina de seguridad biológica clase IIA o IIB3, utilizando bata, guantes y mascarilla de uso exclusivo.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones vienen derivadas de la representatividad y calidad de la muestra, así como del pretratamiento de la misma (descontaminación), y la capacidad del medio para la recuperación de la especie micobacteriana concreta.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Chapin, K.C., and T.L. Lauderdale. 2003. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. In: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
3. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, W.C. Winn. 1997. Mycobacteriology. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA.
4. Murray, R.N. 1995. Mycobacteriology p. 3.0.1-3.16.4. In: H.D. Isenberg (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.
5. Pfyffer, G.E., B.A. Brown-Elliott, and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures, p. 532-559. In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-BK-04
CULTIVO DE MICOBACTERIAS EN MEDIOS LÍQUIDOS MEDIANTE SISTEMAS AUTOMATIZADOS

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
		Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Cultivo de micobacterias mediante sistemas automatizados	PNT-BK-04	
		Edición Nº 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para el aislamiento de micobacterias a partir de muestras clínicas mediante el cultivo en medio líquido con sistemas automatizados.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de hospitales, centros de salud o cualquier laboratorio que realice determinaciones de microbiología clínica y posean la dotación adecuada para el manejo de estos microorganismos.

2. FUNDAMENTO

Actualmente, para la recuperación de micobacterias se recomienda la utilización de un medio sólido y uno líquido para el cultivo primario de muestras clínicas. Los cultivos en medio líquido utilizando sistemas automatizados no radiométricos y con una monitorización continua para la detección del crecimiento son los más propugnados. Estos sistemas se componen de: a) una botella o frasco con el medio de cultivo y un sensor interno que puede ser colorimétrico, fluorogénico o de presión según el método de cada marca comercial; b) un suplemento antibiótico y de enriquecimiento que deberá añadirse antes de la inoculación de las muestras no estériles y previamente descontaminadas (en el caso de muestras estériles sólo se deberá añadir a la botella el enriquecimiento); y c) el aparato o sistema donde las botellas o viales inoculados se introducen. En estos sistemas se incuban y monitorizan de forma continua para la detección del crecimiento micobacteriano. Los microorganismos presentes en la muestra metabolizan los substratos del medio de cultivo y consumen O₂ y producen CO₂. Según el sistema aplicado unos detectarán el consumo de O₂ o la producción CO₂ que producirá un aumento de presión o bien una acidificación del medio. Los sistemas de lectura (cromogénico, fluorogénico o de presión) del equipo detectarán las variaciones que mediante diversos algoritmos, según el programa informático de cada sistema indicarán si existe o no un posible crecimiento. Este deberá ser comprobado mediante la observación microscópica del medio.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica (Procedimiento 10). Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC, 2000.

Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01). SEIMC, 2003.

Procedimientos específicos mencionados en la bibliografía (punto 12).

4. MUESTRAS

Cualquier muestra clínica que presuntamente contenga micobacterias. Algunos sistemas no aceptan la sangre o médula ósea.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Botella o vial con el medio de cultivo líquido específico de cada sistema.

Suplemento de enriquecimiento.

Suplemento antibiótico.

Medio de agar sangre o agar chocolate.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica de clase IIA o IIB3.

- Sistema de incubación y detección automática.

- Vórtex.

- Incubador de CO₂.

- Aguja y jeringuillas estériles de 1ml o pipetas tipo Pasteur.

- Micropipetas de volumen variable.

- Puntas de micropipetas con filtro estériles.

- Asas de siembra estériles

- Algodón o gasa estériles

- Gradillas específicas.

7. PROCESAMIENTO

7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

- Etiquetar o rotular cada botella de cultivo correctamente. Dejar los frascos a temperatura ambiente (30-60 min) antes de la inoculación.

- Cuando se trate de muestras no estériles se deberá reconstituir el suplemento antibiótico con el de enriquecimiento. Dejar que se disuelva el liofilizado. Remover con cuidado para mezclar el contenido. Una vez reconstituido el suplemento antibiótico, suele ser estable durante 7 días guardado a 2-8°C. Escribir la fecha de caducidad del suplemento reconstituido en cada vial.

- Desinfectar los viales que tengan tapón de goma con alcohol de 70° y dejar secar.

- Antes de la inoculación, añadir asépticamente el volumen adecuado del suplemento antibiótico reconstituido a cada frasco de cultivo en el caso de muestras no estériles previamente descontaminadas.

- Añadir sólo el suplemento de enriquecimiento a cada frasco que vaya a utilizarse para el cultivo de muestras estériles.

- Inocular asépticamente el volumen de muestra recomendado por el fabricante al frasco o tubo de cultivo, a la vez que se inocula el medio de cultivo sólido convencional para micobacterias (ej., Löwenteien-Jensen) y una extensión en un portaobjetos para la observación microscópica.

- Introducir las botellas o viales en el sistema automatizado donde se incubarán a 37°C (± 2°C) y se monitorizarán durante 42 días. Aquellos sistemas que puedan incorporar muestras sanguíneas, las botellas o viales inoculadas con estas muestras deberán incubarse un mínimo de 56 días.

- Cuando el instrumento indique que un frasco o vial es positivo, se retirará del sistema, así como todos los cultivos negativos tras los 42 días de incubación.

- Para una explicación más detallada y obtener datos técnicos auxiliares sobre la carga y descarga de los

Servicio de Microbiología Hospital.....	Cultivo de micobacterias mediante sistemas automatizados	PNT-BK-04	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

frascos o viales en cada sistema, se deberá acudir a las instrucciones del fabricante.

7.2. CONTROL DE CALIDAD

- Cada uno de los equipos de cultivo y detección temprana de micobacterias tiene sus propios sistemas para el control de la calidad de los instrumentos, ya sean automáticos o semiautomáticos. En cada caso se deberán seguir las instrucciones y recomendaciones del fabricante.
- El control de calidad de los medios de cultivo utilizados será igual que el descrito en el de medio sólido (PNT-BK-03).

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Todo vial detectado como positivo se deberá agitar bien para mezclar su contenido, obtener una muestra previa desinfección del tapón, si lo requiere, y realizar una extensión y posterior tinción de Ziehl-Neelsen:

a) Si se confirma la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en la extensión del vial, se realizará un subcultivo en una placa de agar sangre o, mejor, en agar chocolate (para descartar flora acompañante), y en un medio sólido para micobacterias (ej., Löwenstein-Jensen) y se seguirán los procedimientos de identificación micobacteriana establecidos.

b) Si la baciloscopia es negativa, lo que podría indicar un posible falso positivo o la precocidad en la detección del crecimiento, se deberá introducir de nuevo el frasco en el instrumento.

c) Si junto a los bacilos ácido-alcohol resistentes se ven otros microorganismos que posteriormente crecen en el agar chocolate, la muestra se deberá descontaminar y sembrar de nuevo y, si esta no se encuentra disponible, descontaminar el contenido del frasco de cultivo e inocular en uno nuevo o bien descartar el cultivo, esperar el cultivo primario en el medio sólido y si este estuviera contaminado solicitar una nueva muestra.

d) Si en la tinción sólo se ven otros microorganismos que no son micobacterias, descartar el cultivo y solicitar una nueva muestra.

- Los resultados obtenidos (cultivos positivos para BAAR o negativos tras 6 semanas) se registrarán en los impresos para tal efecto, así como en la base de datos del programa de gestión del laboratorio. Tanto los resultados a nivel informático, como los que precisen ser informados por papel, deberán ser revisados y validados por el facultativo responsable.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados

emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. En el caso de las micobacterias deberán seguirse las normas básicas de protección frente a los agentes biológicos del grupo 3. Por ello, todos los pasos de la técnica se deben realizar en una cabina de seguridad biológica clase IIA o IIB3, utilizando bata, guantes y mascarilla de uso exclusivo.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones vienen derivadas de la representatividad y calidad de la muestra, así como del pretratamiento de la misma (descontaminación) y la capacidad del medio para la recuperación de la especie micobacteriana concreta.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Chapin, K.C., and T.L. Lauderdale. 2003. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. In: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
3. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, W.C. Winn. 1997. Mycobacteriology. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA..
4. Master, R.N. 1995. Mycobacteriology p. 3.0.1-3.16.4. In: H.D. Isenberg (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.
5. Pfyffer, G.E., B.A. Brown-Elliott, and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures, p. 532-559. In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación fenotípica de las micobacterias	PNT-BK-05	
		Edición N° 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología de un conjunto básico de pruebas para la identificación de los aislamientos micobacterianos en función de sus características fenotípicas, o que puedan servir como complemento a otras técnicas de identificación de estos microorganismos.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que realicen pruebas de identificación de micobacterias y posean la dotación y experiencia adecuada para el manejo de estos microorganismos.

2. FUNDAMENTO

Las micobacterias se suelen clasificar o agrupar según dos características principales: la velocidad de crecimiento y la pigmentación. Según la velocidad de crecimiento de un subcultivo de micobacterias podemos hablar de micobacterias de crecimiento rápido o de crecimiento lento. Dependiendo de la capacidad de las micobacterias para producir pigmentos se pueden diferenciar en tres grupos, no cromógenas, fotocromógenas y escotocromógenas. A esto hay que añadir la temperatura óptima de crecimiento, que puede variar en función del tipo de micobacteria, y diversas pruebas bioquímicas para intentar orientar la identificación de la mayoría de las micobacterias de interés clínico. Aunque existen diversas técnicas para la realización de las pruebas fenotípicas se deberían utilizar las más sencillas y de más fácil estandarización. Por ello, se tiende a recomendar la utilización de métodos comerciales de contrastada calidad.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica (Procedimiento 10). Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC, 2000.

Procedimientos específicos mencionados en la bibliografía (punto 12).

4. MUESTRAS

Cualquier cultivo sólido o líquido con un crecimiento micobacteriano puro, en suficiente cantidad y, a ser posible, reciente.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Medio de 7H9 de Middlebrook y de Dubos.
- Tubos de cultivo de Löwenstein-Jensen con y sin un 5% de NaCl.
- Placas de agar 7H10 o 7H11 de Middlebrook.
- Tiras comerciales para la prueba de la niacina. Conservar de 2-8°C al abrigo de la luz.
- NaNO₃ 0,01 M en tampón fosfato 0,02 M (pH= 7,0). Conservar a 2-8°C, hasta un máximo de 2 meses.
- Sulfanilamida al 0,2%. Conservar a 2-8°C, al abrigo de la luz, hasta un máximo de 1 mes.
- Diclorhidrato de N-(1-naftil)etilendiamina al 0,1%. Conservar a 2-8°C, al abrigo de la luz, hasta un máximo de 1 mes.

- HCl concentrado.
- Peróxido de hidrógeno al 30% (Superoxol).
- Tween 80 al 10%. Mantener el reactivo en la oscuridad y refrigerado entre 2-8°C.
- Tampón (Buffer) de fosfatos (0,067 M, pH= 6).
- Disulfato tripotásico de fenoltaleína
- Carbonato de sodio 2N.
- Medio caldo urea. Conservar entre 2-8° C. La duración es de 1 mes.
- Rojo neutro al 1%.
- Solución acuosa de telurito potásico al 2%. Conservar entre 2-8°C, con un periodo de caducidad de un año.
- Agua destilada estéril o suero fisiológico al 0,9%.
- Glicerol.
- Pirazinamida.
- Piruvato sódico.
- Solución de sulfato amónico ferroso al 1%.
- Solución de citrato amónico férrico al 20%.
- NaOH 10 % en agua destilada (w/v).
- Medio agar de MacConkey sin cristal violeta. Conservar entre 2-8° C.
- Hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH).
- Citrato, manitol, sorbitol e inositol.
- Medio base para el citrato, manitol, sorbitol e inositol: (NH₄)₂SO₄, 2,4 g; KH₂PO₄, 0,5 g; MgSO₄.7H₂O, 0,5 g; agua destilada 950 ml. Ajustar a pH= 7 (citrato) ó 7,2 (azúcares).
- Citrato, manitol, sorbitol e inositol.

Nota: Para la preparación de los reactivos deben seguirse las instrucciones específicas de preparación, control, conservación, etc., consignadas en los procedimientos de preparación de medios y reactivos correspondientes.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica de clase IIA o IIB3.
- Incubador de 37 ± 2°C.
- Incubador de CO₂ de 37 ± 2°C.
- Incubador de 45 ± 2°C.
- Incubador de 30 ± 2°C.
- Baño maría o termobloque a 68 ± 2°C.
- Vórtex.
- Lámpara de tungsteno (100 w).
- Nefelómetro.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Micropipeta de volumen variable.
- Puntas de micropipetas con filtro.
- Asas bacteriológicas estériles.
- Tubos de cristal con tapón de rosca estéril.
- Pinzas estériles.
- Papel de aluminio.
- Bolsas permeables al CO₂.
- Parafilm.
- Gradillas para tubos verticales e inclinados.

7. PROCESAMIENTO

7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

7.1.1 Velocidad y temperatura óptima de crecimiento

- Preparar una suspensión bacteriana de la cepa a identificar (cultivo reciente de 2-3 semanas) en un tubo con suero fisiológico o agua destilada y perlas de vidrio. Conseguir una turbidez equivalente al 1 de McFarland.
- Realizar diluciones seriadas del inóculo hasta una dilución 1/10.000. Para ello preparar cuatro tubos estériles con 9 ml de agua destilada. Pasar 1 ml del inóculo inicial (1 McFarland) al tubo nº 1 y agitar. Pasar 1 ml del tubo nº1 al tubo nº 2, agitar y así sucesivamente hasta el tubo nº 4.
- Sembrar en rejilla con 50 µl del tubo nº 4 (dilución 1/10.000) en cada una de las placas de 7H11 de Middlebrook o Mueller-Hinton a utilizar.
- Normalmente es suficiente incubar una placa a 30°C y otra a 37°C. Si la identificación lo requiere se incuban placas a 24, 30, 37 y 45°C.
- Observar diariamente si aparecen colonias aisladas en la superficie del medio hasta el día 7 en que se realizarán lecturas semanales. Los aislamientos que crezcan en los primeros 7 días serán micobacterias de crecimiento rápido y las que aparezcan después serán especies de crecimiento lento.

7.1.2. Pigmentación

- Coger tres tubos de Löwenstein-Jensen y envolver dos de ellos con papel de aluminio de forma que la luz no pueda llegar al medio.
- Inocular los tres tubos, mediante una pipeta Pasteur, con 0,1 ml de la suspensión preparada en el apartado anterior (7.1.1.) del aislamiento a identificar, e incubar a 37 ± 2 °C con un 5-10% de CO₂.
- Cuando el crecimiento sea visible en el tubo descubierto, se deberán desenvolver los tubos cubiertos y si no presentan pigmentación se expondrá uno de ellos a la luz de una lámpara de tungsteno (100 w) a 20 cm aproximadamente, durante 2 h (1-5 h). Para inducir la producción de pigmento se deberá desenroscar ligeramente el tapón, para que el oxígeno penetre.
- Seguidamente el tubo se cubre y devuelve a la estufa y se observa a las 24 y las 48 horas en busca de un posible cambio en la pigmentación y

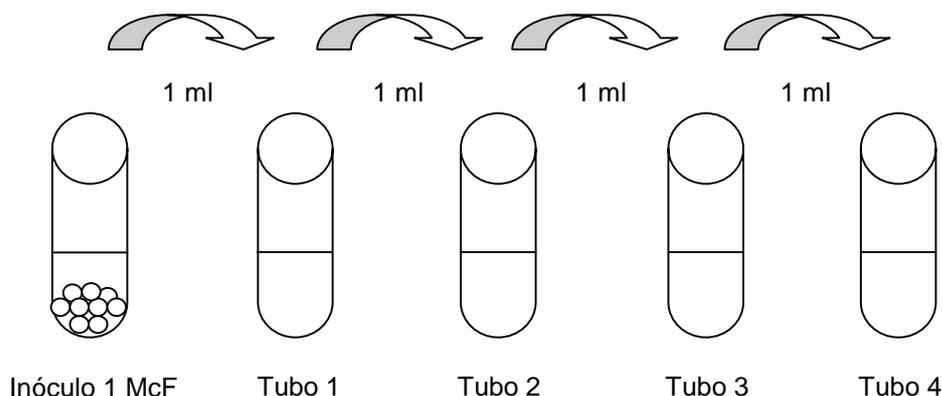
comparación con el otro tubo cubierto y no fotoinducido.

- Cuando todos los tubos permanezcan sin color será una micobacteria no cromógena. Si la pigmentación aparece en el cultivo fotoinducido, la especie será fotocromógena. Si la producción de pigmento aparece en todos los tubos se tratará de una micobacteria escotocromógena.

Nota: Cuando se sospecha *Mycobacterium szulgai*, se deben sembrar dos tubos de Löwenstein-Jensen adicionales, uno tapado y el otro descubierto para incubarlos a 25°C. Esto es debido a que este microorganismo presenta fotocromogenicidad a 25°C pero es escotocromógeno a 37°C.

7.1.3. Prueba de la niacina (Método de las tiras de papel de filtro)

- Partir de un cultivo reciente de 3-4 semanas en Löwenstein-Jensen, bien desarrollado y puro del aislamiento a identificar.
- Cubrir el cultivo con 1 ml de agua destilada estéril. En caso de que el cultivo presente un crecimiento confluyente es preciso practicar una serie de hendiduras en el medio con un asa de siembra. Con esto se consigue que el agua entre en contacto y extraiga la niacina liberada en el medio.
- Colocar el tubo en posición inclinada de forma que el líquido cubra todo el cultivo y dejar incubar durante 20-30 min a temperatura ambiente.
- Pasado el tiempo de incubación extraer 0,6 ml del líquido, aproximadamente, mediante una pipeta Pasteur y transferirlos a un tubo estéril de 13x75 mm. Los tubos no deben ser muy altos ya que pueden dar resultados falsos negativos.
- Con unas pinzas estériles colocar una de las tiras comerciales para la prueba de la niacina en el tubo y cerrar inmediatamente el tapón.
- Agitar suavemente los tubos en posición vertical y repetir la agitación a los 5-10 min.
- Pasados 15 min, pero no más de 30 min, comparar el color de los extractos (líquido). Cuando este sea amarillo, la prueba se considerará positiva (producción de niacina).



Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación fenotípica de las micobacterias	PNT-BK-05	
		Edición N° 01	Página 4 de 7

7.1.4. Reducción de los nitratos

- Se requieren cultivos recientes en un medio sólido de Löwenstein-Jensen o agar de Middlebrook (7H10 o 7H11) de 3-4 semanas del aislamiento a identificar. En las micobacterias de crecimiento rápido bastará con 2-3 semanas.
- Dispensar unas gotas (0,2 ml) de agua destilada estéril en un tubo de tapón de rosca de 16X125 mm.
- Resuspender dos asas de siembra llenas del cultivo y emulsionar por completo las colonias en el agua.
- Añadir 2 ml del sustrato para los nitratos (NaNO₃ 0,01 M en tampón fosfato 0,02 M).
- Agitar manualmente e incubar en baño maría a 37 ± 2°C durante 2 horas.
- Añadir 1 gota de HCl concentrado (reactivo 1). Seguidamente añadir 2 gotas sulfanilamida al 0,2% (reactivo 2) y 2 gotas de diclorhidrato de *N*-(1-naftil) etilendiamina al 0,1% (reactivo 3).
- Examinar inmediatamente el cambio del color, de transparente a rosado-rojo (positivo).

7.1.5. Prueba de la catalasa a 68°C (termoestable)

- Dispensar en un tubo de tapón de rosca 0,5 ml de tampón fosfato 0,067 M.
- Resuspender varias colonias de un cultivo reciente (2-4 semanas) del aislamiento a identificar. Mediante un asa de siembra emulsionar el cultivo hasta conseguir una solución homogénea.
- Incubar los tubos en baño maría a 68 ± 2°C durante 20 minutos exactos.
- Pasado este tiempo, retirar los tubos y dejarlos enfriar a temperatura ambiente 10 min.
- Añadir 0,5 ml del reactivo de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada al 30%) y Tween 80 al 10% mezclados en el mismo momento de su uso a partes iguales.
- Dejar los tubos en reposo y sin agitar, un máximo de 20 min a temperatura ambiente.
- Observar visualmente la aparición de burbujas.
- Hacer una réplica del proceso, pero incubando a 37 ± 2°C.
- Cuando se observen burbujas tanto en el tubo incubado a 37°C como a 68°C, el resultado será positivo para la catalasa termoestable.

7.1.6. Prueba de la catalasa semicuantitativa

- Sembrar un medio líquido de 7H9 de Middlebrook a partir de un cultivo reciente (2-4 semanas) del aislamiento a identificar. Mediante un asa de siembra emulsionar por completo varias colonias del cultivo hasta conseguir una solución homogénea.
- Incubar 7 días a 37 ± 2°C.
- Mezclar 5-10 segundos en el vórtex.
- Transferir 0,2 ml a un medio de Löwenstein-Jensen.
- Incubar los tubos 14 días a 37 ± 2°C, con los tapones aflojados.
- Agregar 1 ml del reactivo de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada al 30%) y Tween 80 al 10% mezclados en el mismo momento de su uso a partes iguales.

- Dejar los tubos en reposo a temperatura ambiente durante 5 min.

- Mantener los tubos en posición vertical y medir la altura de la columna de burbujas para ver si es >45 mm (positivo o catalasa fuerte) o <45 mm (negativo o catalasa débil).

Nota: Para acelerar el proceso de identificación se puede partir de una suspensión densa a partir de un cultivo reciente e inocular directamente el tubo de Löwenstein-Jensen.

7.1.7. Prueba de la arilsulfatasa

- Partir de un cultivo joven (2-4 semanas), puro y bien crecido del aislamiento a identificar.
- Inocular el tubo de sustrato (2 ml) de la arilsulfatasa (0,2 g de disulfato tripotásico de fenoltaleína, 100 ml de caldo 7H9 de Middlebrook y 0,2% de glicerol). Mediante un asa de siembra emulsionar por completo varias colonias del cultivo en el caldo.
- Incubar durante 3 días a 30 ± 2 °C en estufa para las micobacterias de crecimiento rápido y a 37-42 ± 2 °C ante la sospecha de *M. xenopi*. En el caso de otras micobacterias de crecimiento lento (*M. triviale*) incubar durante 14 días a 37 ± 2 °C.
- Tras la incubación añadir 6 gotas de la solución de carbonato de sodio 2N, mezclar y observar la aparición de color rosa-rojo (positivo).

7.1.8. Prueba de la ureasa (Técnica de Wayne)

- Partir de un cultivo reciente (2-4 semanas), puro y bien crecido del aislamiento a identificar.
- Inocular un tubo con el sustrato específico (3 ml de caldo de urea: 1 parte de urea agar base en 9 de agua destilada). Mediante un asa de siembra emulsionar por completo varias colonias del cultivo en el caldo.
- Incubar a 37°C hasta 5 días.
- Leer visualmente los tubos a los 3 y 5 días si adquieren un color rosa fuerte o rojo (positivo). Cuando el color sea ligeramente rosa se deberá repetir la prueba.

7.1.9. Hidrólisis del Tween 80

- Partir de un cultivo reciente (2-4 semanas), puro y bien crecido del aislamiento a identificar.
- Inocular un tubo con el sustrato (2 ml) específico (0,5 ml de Tween 80, 100 ml de tampón fosfato 0,067 M y 2 ml de rojo neutro al 1%). Mediante un asa del cultivo emulsionar por completo varias colonias del cultivo en el caldo.
- Incubar a 37 ± 2 °C y al abrigo de la luz durante 10 días.
- Sin agitar los tubos, se leerán a los 5 y 10 días para observar si aparece un color rosa o rojo (positivo). Si el color es ligeramente rosa o equivoco se deberá repetir la prueba.

7.1.10. Reducción del telurito

- Partir de un cultivo reciente (2-4 semanas), puro y bien crecido del aislamiento a identificar.
- Inocular un tubo con perlas de vidrio y 5 ml de caldo 7H9 de Middlebrook. Mediante un asa de

Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación fenotípica de las micobacterias	PNT-BK-05	
		Edición N° 01	Página 5 de 7

siembras emulsionar por completo abundantes colonias del cultivo en el caldo.

- Incubar a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta apreciar crecimiento en el caldo (3-7 días aproximadamente).
- Pasado este período añadir 2 gotas del reactivo de telurito (solución acuosa al 2% de telurito potásico) a cada tubo inoculado y bien crecido.
- Incubar de nuevo a $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
- A los 3 días examinar en busca de un precipitado negro en el fondo del tubo (positivo).

7.1.11. Tolerancia al cloruro de sodio

- Partir de un cultivo reciente (2-4 semanas), puro y bien crecido del aislado a identificar.
- Inocular 0,1 ml de una suspensión densa de la micobacteria en dos tubos de Löwenstein-Jensen; uno sin y otro con un 5% de NaCl.
- Incubar a 30°C para las micobacterias de crecimiento rápido y a 37°C para las lentas, hasta observar o no crecimiento (2-4 semanas).

7.1.12. Prueba de la pirazinamidasas en agar

- Partir de un cultivo reciente (2-4 semanas), puro y bien crecido del aislado a identificar.
- Inocular 0,1 ml de una suspensión densa de la micobacteria en un tubo con 5 ml del sustrato específico (6,5 g de medio base de Dubos, 0,1 g de pirazinamida, 2 g de piruvato sódico, 15 g de agar y 1 l de agua).
- Incubar 4 días a 37°C con el tapón desenroscado.
- Añadir 1 ml de una solución fresca de sulfato amónico ferroso al 1% y esperar 4 h. La prueba es positiva si aparece una banda rosa en el agar.

7.1.13. Incorporación o captación del hierro

- Partir de un cultivo reciente (1-2 semanas) puro y bien crecido del aislado de crecimiento rápido a identificar.
- Inocular con 0,2 ml de una suspensión densa de la micobacteria un tubo de Löwenstein-Jensen.
- Incubar 37°C hasta que exista un crecimiento visible. Añadir una gota de una solución de citrato amónico férrico al 20 %, por cada ml de medio de Löwenstein-Jensen presente en el tubo.
- Incubar de nuevo a 30°C hasta 3 semanas más. Las colonias que captan el hierro presentarán un color marrón muy oscuro (positivo).

7.1.14. Crecimiento en agar de MacConkey sin cristal violeta

- Partir de un cultivo reciente (1-2 semanas), puro y bien crecido del aislado de crecimiento rápido a identificar.
- Inocular un tubo con perlas de vidrio y caldo 7H9 de Middlebrook con un asa de siembras. Emulsionar por completo varias colonias del cultivo en el caldo.
- Sembrar una placa de agar MacConkey sin cristal violeta con 3-4 gotas del caldo emulsionado, mediante una pipeta Pasteur estéril y estriar por agotamiento para obtener colonias aisladas.
- Incubar las placas 11 días a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ sin CO_2 .
- Examinar las placas a los 5 y 11 días, para detectar el posible crecimiento (positivo).

7.1.15. Sensibilidad al TCH (hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico)

- Partir de un cultivo reciente (2-5 semanas), puro y bien crecido del aislamiento a identificar.
- Inocular un tubo con perlas de vidrio y 5-8 ml de caldo 7H9 de Middlebrook. Mediante un asa de siembra emulsionar por completo abundantes colonias del cultivo en el caldo.
- Agitar con un vórtex durante 3 min. Dejar reposar 15 min para permitir que los posibles grumos desciendan al fondo del tubo.
- Transferir 1 ml de la suspensión y ajustar a una turbidez 1 McFarland con agua destilada.
- Preparar diluciones 10^{-3} (1:1000) y 10^{-4} (1:10000) con agua destilada e inocular 3 gotas de cada en placas de agar 7H11 de Middlebrook con y sin 10 $\mu\text{g/ml}$ de TCH.
- Envolver las placas en bolsas permeables al CO_2 o, en su defecto, sellarlas con Parafilm.
- Incubar 3 semanas a 37°C con 5-10 % de CO_2 .
- El crecimiento en la placa con TCH >1% del crecimiento en las placas de control sin TCH, catalogará a la cepa como resistente al TCH.

7.1.16. Prueba de crecimiento en sustratos (citrato, manitol, sorbitol o inositol)

- Partir de un cultivo reciente, puro y bien crecido del aislado a identificar.
- Inocular 0,2 ml de una suspensión de la micobacteria en cada tubo con sustrato (citrato sódico o azúcar en un medio base: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,4 g; KH_2PO_4 , 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; agua destilada 950 ml; pH= 7 para el citrato ó 7,2 para los azúcares).
- Se utilizará un tubo con sustrato sin inocular como control negativo.
- Incubar a $25-28^\circ\text{C}$ durante 2 semanas.
- Examinar los tubos para detectar el posible crecimiento (positivo).

7.2. CONTROL DE CALIDAD

- Cada día, se deberá examinar el color, la presencia de deshidratación (medios sólidos) y la fecha de caducidad de los medios y reactivos a utilizar.
- Los resultados deberán registrarse y cuando estos no sean correctos se deberán llevar a cabo nuevos controles. Las medidas correctivas podrían incluir la realización de pruebas adicionales que determinen el problema del medio o la notificación al fabricante para el reemplazo completo del lote. En los medios fabricados en el laboratorio habría que revisar el procedimiento de preparación y los reactivos utilizados.
- En las pruebas fenotípicas y, especialmente, en las bioquímicas se debe utilizar un control positivo y uno negativo:

Velocidad de crecimiento

Micobacteria de crecimiento rápido: *M. fortuitum* o *M. chelonae*.

Micobacteria de crecimiento lento: *M. tuberculosis*.

Pigmentación

Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación fenotípica de las micobacterias	PNT-BK-05	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

Micobacteria no cromógena: *M. fortuitum* o *M. chelonae*

Micobacteria fotocromógena: *M. kansasii*.

Micobacteria escotocromógena: *M. gordonae*.

Prueba de la niacina

Control positivo: *M. tuberculosis*.

Control negativo: *M. avium* o *M. intracellulare*.

Reducción de nitratos

Control positivo: *M. tuberculosis*.

Control negativo: *M. avium* o *M. intracellulare*.

Prueba de la catalasa a 68°C

Control positivo: *M. fortuitum* o *M. kansasii*.

Control negativo: *M. tuberculosis*.

Prueba de la catalasa semicuantitativa

Control positivo: *M. fortuitum* o *M. kansasii*.

Control negativo: *M. tuberculosis*.

Prueba de la arilsulfatasa

Control positivo (3 días): *M. fortuitum*.

Control positivo (14 días): *M. triviale*.

Control negativo (3 días): *M. avium* o *M. intracellulare*.

Control negativo (14 días): *M. terrae*.

Prueba de la ureasa

Control positivo: *M. kansasii*.

Control negativo: *M. avium* o *M. intracellulare*.

Hidrólisis del Tween 80

Control positivo: *M. kansasii*.

Control negativo: *M. avium* o *M. intracellulare*.

Reducción del telurito

Control positivo: *M. avium* o *M. intracellulare*.

Control negativo: *M. tuberculosis*

Tolerancia al cloruro de sodio

Control positivo: *M. fortuitum*.

Control negativo: *M. gordonae* o *M. tuberculosis*.

Actividad pirazinamidasa en agar

Control positivo: *M. avium* o *M. intracellulare*.

Control negativo: *M. kansasii* o sin inóculo.

Captación de hierro

Control positivo: *M. fortuitum*.

Control negativo: *M. chelonae*.

Crecimiento en McConkey sin cristal violeta

Control positivo: *M. fortuitum*.

Control negativo: *M. phlei* o sin inóculo.

Sensibilidad al TCH

Control positivo: *M. bovis*.

Control negativo: *M. tuberculosis*.

Crecimiento en sustratos

Control positivo: *M. chelonae* (citrato) y *M. smegmatis* (azúcares).

Control negativo: medio sin inocular.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

La mayoría de los resultados se basan en la detección visual del crecimiento o cambios de color, de los diferentes medios y reactivos utilizados. Para su valoración se deberán comparar con los resultados de los controles positivos y negativos llevados a cabo de forma simultánea. La interpretación se hará de acuerdo a las tablas de identificación fenotípica existentes en la literatura

(ver bibliografía). Los obtenidos se registraran en los impresos para tal efecto, así como en la base de datos del programa de gestión del laboratorio. Tanto los resultados a nivel informático como los que precisen ser informados por papel deberán ser revisados y validados por el facultativo responsable.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. En el caso de las micobacterias deberán seguirse las normas básicas de protección frente a los agentes biológicos del grupo 3. Por ello, todos los pasos de la técnica se deben realizar en una cabina de seguridad biológica clase IIA o IIB3, utilizando bata, guantes y mascarilla de uso exclusivo.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las principales limitaciones de la identificación convencional de micobacterias consisten en la lentitud en la obtención de los resultados, así como en la dificultad para llegar a la diferenciación e identificación de diversas especies micobacterianas. Algunas pruebas bioquímicas pueden presentar dificultades en su interpretación, a pesar de utilizar los controles de calidad adecuados.

Es fundamental tener en cuenta que la identificación de una micobacteria no se puede basar en una sola prueba, sino en una batería de las mismas

12. BIBLIOGRAFÍA

- Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. ASM, Washington, D.C.
- Chapin, K.C., and T.L. Lauderdale. 2003. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. In: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, W.C. Winn. 1997. Mycobacteriology. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA.
- Lévy-Frébault, V.V., and F. Portaels. 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 42 (2):315-323.
- Master, R.N. 1995. Mycobacteriology p. 3.0.1-3.16.4. In: H.D. Isenberg (ed.), Clinical Microbiology

Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación fenotípica de las micobacterias	PNT-BK-05	
		Edición Nº 01	Página 7 de 7

Procedures Handbook, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.

6. Vincent, V., B.A. Brown-Elliott, K.C. Jost Jr., and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: Phenotypic and Genotypic Identification, p. 560-584. *In*: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación de micobacterias mediante HPLC	PNT-BK-06	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la identificación de micobacterias, a partir de aislamientos clínicos, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que realicen pruebas de identificación de micobacterias y que posean equipos de cromatografía y experiencia en su manejo.

2. FUNDAMENTO

El análisis cualitativo de la composición lipídica de la pared de las micobacterias, es útil para diferenciar especies o grupos de especies. La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) permite la detección cualitativa de ésteres de p-bromofenacil de ácidos grasos de los ácidos micólicos, obtenidos a través de un proceso de extracción por saponificación. Las muestras obtenidas son analizadas en un cromatógrafo HPLC, diferenciando picos que corresponden a ácidos grasos o agrupaciones de éstos. Los picos se identifican según sus tiempos de retención en el interior del cromatógrafo. El análisis del patrón de ácidos grasos de cada muestra se utiliza para la identificación de especie.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica (procedimiento 10). Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC, 2000.

Procedimientos específicos mencionados en la bibliografía (punto 12).

4. MUESTRAS

Aislamientos puros de micobacterias crecidos en medio sólido.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Reactivo de saponificación: 200 g de hidróxido de potasio, 400 ml de metanol y 400 ml de agua destilada.
- Cloroformo.
- Reactivo de acidificación: 400 ml de HCl, 400 ml de agua destilada.
- Reactivo de bicarbonato potásico: 4 g de KHCO_3 , 98 ml de metanol y 98 ml de agua destilada
- Reactivo de derivación: acetonitrilo conteniendo 0,1 mmol/ml de bromuro de bromofenacil y 0,005 mmol/ml de ciclohexil-eter.
- Reactivo de aclarado: 100 ml de reactivo de acidificación y 100 ml de metanol.
- Cloruro de metilo
- Diluyente de la muestra: 500 ml de diclorometano, 4 mg de estándar interno de bajo peso molecular y 2 mg de estándar interno de alto peso molecular.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica clase IIA o IIB3.
- Agitador vórtex.

- Pipetas de cristal tipo Pasteur.
- Asas metálicas.
- Tubos de cristal de 10-15 ml autoclavables, preferiblemente de fondo redondeado, con tapón a rosca y cubierta interior de teflón. No son útiles cubiertas de goma o plástico ya que pueden resultar digeridas por la mezcla disolvente y contaminar la muestra.
- Baño maría o bloque seco.
- Cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC)
- Columna C18 de fase reversa, de 7,5 cm de longitud, 4-6 mm de diámetro interno y relleno de sílice de 3 μm .
- Sistema de evaporación de tubos con flujo de nitrógeno.
- Jeringuillas tipo Hamilton con capacidad de inyección de 1 μl .

7. PROCESAMIENTO

7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

7.1.1. Extracción de ácidos grasos

- Las cepas deben incubarse previamente hasta lograr un crecimiento abundante. Aunque se pueden utilizar diversos medios de cultivo sólidos, el mejor rendimiento se consigue con agar de Middlebrook 7H10 ó 7H11 y en atmósfera con un 5% de CO_2 .
- Se toman 1-2 asas del cultivo, utilizando asa metálica o escobillón de poliéster y se añaden a un tubo conteniendo 2 ml del reactivo de saponificación, procurando disolver al máximo la masa bacteriana. Agitar con vórtex 20 s.
- Los tubos deben ser de cristal y tener membrana interna de teflón en el tapón.
- Se esterilizan los tubos con las muestras a 121°C durante una hora o en baño seco 2 h a 100°C. Para facilitar la evaporación, se sustituyen los tapones por papel de aluminio en este paso.
- Se deja enfriar y se añaden 2 ml de cloroformo y 1,5 ml del reactivo de acidificación.
- Se agita en vórtex durante 20 s, dejando separar las dos fases durante 20-30 s. Si la fase superior está turbia se vuelve a agitar durante 1 min.
- Se extrae la fase superior (cloroformo más ácidos micólicos) con pipeta Pasteur de cristal y se pasa a un tubo nuevo. En este punto la muestra puede guardarse a 4°C para seguir el proceso al día siguiente.
- Se evapora el cloroformo utilizando un bloque seco a 85-105°C conjuntamente a flujo de aire. También puede utilizarse un bloque seco con sistema de vacío.
- Se añade 0,1 ml de reactivo de bicarbonato potásico
- Se evapora, nuevamente, con un bloque seco a 85-105°C.
- Se deja enfriar a temperatura ambiente y se añade 1 ml de cloroformo y 50 μl del reactivo de derivación.
- Se agita en vórtex 30 s y se seca en un bloque seco a 85-105°C durante un mínimo de 20 min.
- Se deja enfriar a temperatura ambiente y se añade 1ml de reactivo de aclarado.
- Se agita en vórtex durante 20 s para separar las fases.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación de micobacterias mediante HPLC	PNT-BK-06	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

- Se extrae la fase superior (cloroformo) con pipeta Pasteur de cristal y se pasa a un nuevo tubo.
- Se evapora de nuevo con un bloque seco a 85-105°C.
- Se almacena a 4°C hasta efectuar el análisis.
- Se disuelve la muestra en 50 a 500 µl de diluyente de la muestra. La cantidad adecuada para la dilución depende de la muestra. La situación ideal es que los picos pequeños presentes en la muestra sean evidentes en el cromatograma para poder ser interpretados y que los picos grandes quepan bien en el registro.

Condiciones cromatográficas

- El flujo de solvente debe ser constante a 2,5 ml/min.
- La mezcla de solvente al iniciar la inyección debe ser de 98% de metanol (solvente A) y 2% de cloruro de metilo (solvente B)
- Durante el primer minuto de inyección la mezcla se cambia a 80% del solvente A y 20% del solvente B.
- Durante los 9 min siguientes, con gradiente lineal, el solvente A se cambia al 35% y el B al 65%.
- Durante los 30 s siguientes, el solvente A vuelve a un 98% y el B a un 2%, manteniéndose así 4-5 min más.

7.2. CONTROL DE CALIDAD

- Antes de analizar las muestras problema deben utilizarse controles positivos (*M. intracellulare* ATCC 13950) y controles negativos (*C. albicans* ATCC 60193)
- También deben pasarse patrones estándar mezcla de ácidos grasos. Muchos de ellos están disponibles comercialmente. Se analizarán semanal o quincenalmente y cada vez que se cambie la columna o se perciban alteraciones en los perfiles cromatográficos de las muestras.
- Deben pasarse controles conocidos para comprobar que el análisis es adecuado. Si se utiliza a diario son suficientes 1-2 veces por semana. Si se usa ocasionalmente, debería realizarse cada día en que se lleve a cabo la técnica.
- Todas las muestras contienen estándares internos, que garantizan que el cromatograma es correcto.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- El cromatograma puede evidenciar grupos de picos, que pueden ser únicos, dobles, triples o múltiples. Cuando todos los picos se acumulan en un único grupo la identificación es más difícil ya que una proporción importante de especies sigue este patrón.
- Antes de aproximar la identificación deben descartarse los cromatogramas correspondientes a otras bacterias. En general, las muestras con picos que aparecen antes de los tres minutos y terminan antes de los 6 ó 5 minutos, no suelen corresponder a micobacterias.
- Cada centro ha de poseer un banco de patrones de las especies más frecuentemente aisladas para comparar con las muestras.
- La comparación puede hacerse superponiendo una transparencia del patrón y la muestra, ya que los

tiempos de retención relativos de cada pico en diferentes muestras serán constantes.

- En muestras o especies con patrones muy similares puede ser necesario utilizar el *ratio* de altura entre los picos.
- Existen cromatogramas patrones disponibles en la literatura que son útiles para la elaboración de los patrones propios (referencias 4 y 5).
- Los resultados obtenidos se registraran en los impresos para tal efecto, así como en la base de datos del programa de gestión del laboratorio. Tanto los resultados a nivel informático como los que precisen ser informados por papel deberán ser revisados y validados por el facultativo responsable.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. En el caso de las micobacterias deberán seguirse las normas básicas de protección frente a los agentes biológicos del grupo 3. Por este motivo, todos los pasos iniciales de la extracción de la técnica se deben realizar en una cabina de seguridad biológica clase IIA o IIB3, utilizando bata, guantes y mascarilla de uso exclusivo. El cromatógrafo requiere una instalación de gases para su funcionamiento. Por ello, debe ubicarse lejos de fuentes de calor y han de realizarse las supervisiones adecuadas.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El sistema no permite la diferenciación de algunas especies con claridad.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, and W.C. Winn. 1997. Mycobacteriology. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA.
3. Master, R.N. 1995. Mycobacteriology p. 3.0.1-3.16.4. In: H.D. Isenberg (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación de micobacterias mediante HPLC	PNT-BK-06	
		Edición Nº 01	Página 4 de 4

4. Standardized Method for HPLC Identification of Mycobacteria. 1996. HPLC Users Group. US Department of Health and Human Services.
5. Mycolic Acid Pattern Standards for HPLC Identification of Mycobacteria. 1999. HPLC Users Group. US Department of Health and Human Services.

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es definir la metodología para la identificación de micobacterias, a partir de cultivos crecidos, mediante la PCR-RFLP del gen *hsp65* (PRA). Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que realicen pruebas de identificación de micobacterias y posean la dotación y experiencia adecuada para el manejo de estos microorganismos y las técnicas de amplificación genómica.

2. FUNDAMENTO

La PCR-RFLP del gen *hsp65*, es una técnica genotípica para la identificación rápida y específica de las infecciones por micobacterias. Esta se basa en la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de una zona de DNA concreta (gen *hsp65*), seguida de una restricción del producto de amplificación mediante dos enzimas de restricción (*BstEII* y *HaeIII*). El análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) permite diferenciar las especies y, a veces, las subespecies micobacterianas.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica (Procedimiento 10). Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC, 2000.

Procedimientos específicos mencionados en la bibliografía (punto 12).

4. MUESTRAS

Cualquier cultivo sólido o líquido con crecimiento puro de bacilos ácido-alcohol resistentes.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM; pH= 8).
- TBE 1x.
- Solución de lavado (EDTA 50 mM, SDS 10%; pH= 7,2).
- Dinucleotidos trifosfato (dNTP).
- *Primers* o iniciadores o cebadores TB11 (5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT) y TB12 (5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT).
- Tampón de la PCR.
- MgCl₂ (si no estuviera incluido en el tampón de PCR).
- *Taq* Polimerasa.
- Enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*.
- Tampón de carga para electroforesis.
- Marcadores de pesos moleculares (100 bp ADN *ladder* y FX174 RF ADN *HaeIII Digest*).
- Agarosa MetaPhor.
- Agua destilada.
- Bromuro de etidio.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica de clase IIA o IIB3.
- Agitador rotatorio Vórtex.
- Gradillas congeladora (-20°C) y refrigeradora (2-8°C)

- Microcentrífuga (13.000 rpm).
- Sonicador.
- Bloques de calor seco o termobloques.
- Termociclador rápido para tubos de microcentrífuga de 0,2 ml.
- Fuente de alimentación para electroforesis convencional.
- Cubetas de electroforesis.
- Transiluminador de UV.
- Equipo fotográfico.
- Frigorífico (2-8°C).
- Congelador (-20°C).
- Agujas y jeringuillas de 2 o 5 ml.
- Micropipetas de volumen variable (0,5-10 µl; 5-40 µl; 40-200 µl; 200-1000 µl).
- Puntas de micropipetas con filtro estériles.
- Tubos de microcentrífuga tipo Eppendorf.
- Asas de siembra estériles.
- Bandejas portatubos de microcentrífuga.
- Cajas de congelación para tubos de microcentrífuga.

7. PROCESAMIENTO

7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

7.1.1. Extracción del DNA

- A partir de un medio sólido se debe resuspender 1 colonia en 200 µl del tampón TE (pH= 8) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Si el cultivo está en un medio líquido se centrifugan 1 ml del medio en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml a 12-13.000 rpm durante 5 min. Después se resuspende el sedimento en 200 µl del tampón TE (pH= 8).
- Incubar a 85°C durante 30 min.
- Añadir 200 µl de cloroformo.
- Centrifugar a 12-13.000 rpm durante 10-15 min.
- Recoger cuidadosamente el sobrenadante (100-150 µl) y transferirlo a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml con tapón de rosca.
- Rotular el tubo con el número congelación que le corresponda y guardar a -20°C en el congelador de la habitación de dispensación del DNA.

7.1.2. Amplificación

a) Preparación de los tubos de AMPLIMIX (Volumen 25 µl)

- Todo el trabajo se llevará a cabo en la cabina para PCR dentro de la habitación de PCR limpia-limpia. La bata y guantes serán de un solo uso y exclusivos para esa estancia.
- Preparar entre 1 y 10 tubos de microcentrífuga de 1,5 ml estériles para la solución madre (Tris-HCL 20 mM, KCL 50 mM, CL₂Mg 1,5 mM, dNTPs 400 µM):

Amplimix	1 reacción	42 reacciones 43 (tubo 1,5 ml)
H ₂ O destilada estéril	14 µl	588 µl
Tampón de la PCR	5 µl	210 µl
MgCL ₂	6 µl	252 µl
DNTPs	0,4 µl	16,8 µl

Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación de micobacterias mediante PCR-RFLP del gen <i>hsp65</i>	PNT-BK-07	
		Edición Nº 01	Página 3 de 4

- Una vez realizada la mezcla se repartirán en tubos tipo eppendorf de 0,2 ml en alícuotas de 25 µl y conservar a -20°C en el congelador de la habitación de PCR limpia.

b) Preparación del MASTERMIX (Volumen 25 µl)

- En la misma habitación limpia-limpia se preparará el día a realizar la reacción de PCR, la solución madre en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Calcular siempre una reacción más de las necesarias debido a las mermas en la manipulación:

Mastermix	1 reacción	10 reacciones
H ₂ O destilada estéril	21,5 µl	215 µl
Primer TB 11 (50 pmol)	0,5 µl	5 µl
Primer TB 12 (50 pmol)	0,5 µl	5 µl
Taq Polimerasa	0,25 µl	2,5 µl

- Añadir 20 µl del Mastermix a cada tubo de Amplimix.

c) Mezcla, carga del DNA y reacción de Amplificación (Volumen final 50 µl)

- Añadir en la habitación de dispensación de material genético 5 µl del DNA a amplificar.
- Posteriormente se dispondrán los tubos tipo eppendorf de PCR (0,2 ml) en un termociclador rápido: 5 min de desnaturalización a 94°C; 45 ciclos de amplificación (1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C); 10 min de extensión a 72°C.
- Tras la amplificación se tomarán 5 µl del producto de amplificación y se llevará a cabo una electroforesis en un gel de agarosa (ver apartado de "electroforesis") para observar si ha existido la amplificación y poder realizar la restricción.

7.1.3. Restricción enzimática

- Se realizarán dos restricciones por cada amplificado. Para ello se prepara el Mastermix de cada enzima de restricción (*Bst* EII y *Hae* III). Calcular siempre una reacción más de las necesarias debido a las mermas en la manipulación:

Mastermix de restricción	1 reacción	10 reacciones
H ₂ O destilada estéril	11,5 µl	115 µl
Tampón de restricción 10X	2,5 µl	25 µl
Enzima	1 µl	10 µl

- El enzima se añadirá al final del todo conservando la mezcla en hielo.
- Mezclar 10 µl del producto de PCR (amplificado) con 15 µl del Mastermix de restricción.
- Incubar 60-90 min a la temperatura apropiada (60°C para *Bst* EII y 37°C para *Hae* III).
- Añadir 5 µl del tampón de carga a cada tubo y disponer en hielo o en frigorífico (2-8°C) hasta realizar la electroforesis.

7.1.4. Electroforesis

- Preparar un gel de agarosa al 1-1,5% para ver el producto de PCR, o del 3% de una agarosa con gran

nivel de discriminación (Agarosa Metaphor) para la restricción. El gel se preparará con TBE 1x.

- Cargar el gel con 5 µl del producto de PCR o 10 µl si es de restricción. Para el producto de PCR habrá que añadir, antes de cargar el gel, 1 µl de tampón de carga por cada 5 µl de amplificado.
- Utilizar marcadores de peso molecular (100 bp ADN ladder y FX174 RF ADN *Hae*III Digest o similares) y algún patrón de restricción de alguna cepa conocida que, fundamentalmente, cubran el intervalo entre 100 y 200 pares de bases aproximadamente.
- Migrar el gel entre 100 y 160 voltios según las características de la cubeta. Una vez que la línea de migración (tampón de carga) esté a 1 cm aproximadamente del final del gel, parar la electroforesis.
- Teñir con TBE 1x y bromuro de etidio durante 30-60 min en la oscuridad.
- Observar con luz ultravioleta (transiluminador) y fotografiar si procede.

7.2. CONTROL DE CALIDAD

- Deben establecerse etiquetados y controles de caducidad de los reactivos y soluciones de biología molecular, de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes o de la literatura.
- Para la amplificación deberán incluirse un control negativo y un control positivo (por ej., *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. intracellulare* o *M. avium*).
- Para posibilitar la interpretación de los resultados de la electroforesis deberán incluirse marcadores de peso molecular adecuados. Es aconsejable usar marcadores que incluyan bandas con diferencias de 10 a 20 pares de bases y colocados con la frecuencia adecuada para poder evaluar pequeñas diferencias entre las diversas muestras.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Los resultados se basan en la observación visual de los diferentes patrones de restricción con ambas enzimas (*Bst* EII y *Hae* III) obtenidos en la electroforesis. La interpretación de los patrones se hará de acuerdo a la base de datos de la página web: <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>. Aunque no es imprescindible, la utilización de un software para el análisis de imágenes puede facilitar la comparación de los patrones de restricción.
- Los resultados obtenidos se registrarán en los impresos para tal efecto, así como en la base de datos del programa de gestión del laboratorio. Tanto los resultados a nivel informático como los que precisen ser informados por papel deberán ser revisados y validados por el facultativo responsable.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Identificación de micobacterias mediante PCR-RFLP del gen <i>hsp65</i>	PNT-BK-07	
		Edición Nº 01	Página 4 de 4

El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. En el caso de las micobacterias deberán seguirse las normas básicas de protección frente a los agentes biológicos del grupo 3. En las técnicas de biología molecular y especialmente de amplificación genómica existen diversos aspectos estructurales y de praxis técnica que se deberán tener en cuenta.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones son las comunes a cualquier proceso de amplificación genómica y posterior restricción enzimática. Por ello, ante la posibilidad de contaminaciones cruzadas con los amplicones o ausencia de amplificación, se aconseja introducir controles internos positivos y negativos, así como marcadores moleculares adecuados en la electroforesis que permitan una correcta interpretación de los patrones de bandas obtenidos. En muchos casos se obtienen patrones aún no identificados o determinados y que requieren pruebas complementarias fenotípicas o moleculares (secuenciación) para poder llegar a un diagnóstico de especie.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Devallois, A, K.S. Goh, and N. Rastogi. 1997. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* 35:2969-2973.
2. Prod'hom, G., V. Vincent, G.E. Pfyffer, and A. Telenti. PRASITE: Identification of Mycobacteria. Web page : <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>
3. Taylor, T.B., C. Patterson, Y. Hale, and W.W. Safranek. 1997. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J. Clin. Microbiol.* 35:79-85.
4. Telenti, A., F. Marchesi, M. Balz. F. Bally, E.C. Böttger, and T. Bodmer. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31:175-178.
5. Vincent, V., B.A. Brown-Elliott, K.C. Jost Jr., and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: Phenotypic and Genotypic Identification, p. 560-584. In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección directa de <i>M. tuberculosis</i> mediante amplificación genética (PCR)	PNT-BK-08	
		Edición Nº 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la detección directa del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de la secuencia específica IS6110.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica que realicen pruebas de identificación de micobacterias y posean la dotación y experiencia adecuada para el manejo de estos microorganismos y las técnicas de amplificación genómica.

2. FUNDAMENTO

Las técnicas de amplificación genómica permiten multiplicar *in vitro* de manera exponencial un fragmento de ácidos nucleicos (la secuencia diana), hasta unos niveles que la hacen fácilmente detectable. La diana elegida en esta técnica, es la secuencia de inserción IS6110 específica del complejo *M. tuberculosis*. Se trata de un elemento repetitivo, cuyas copias (del orden de 10 a 16) están presentes en la mayoría de los aislamientos clínicos.

En la técnica de PCR, la amplificación se lleva a cabo mediante una polimerasa termoestable (*Taq* ADN polimerasa). El proceso completo consta de tres fases:

- Fase de extracción de ácidos nucleicos. Se inicia una vez que las muestras clínicas han recibido el pretratamiento habitual (descontaminación-digestión). Las bacterias contenidas en la muestra deben ser lisadas para que se liberen los ácidos nucleicos.
- Fase de amplificación. Mediante un termociclador se realizan diversos ciclos con tres pasos cada uno: desnaturalización, hibridación con los iniciadores ("*primers*" específicos para la secuencia IS6110) y síntesis de la cadena complementaria.
- Fase de detección del producto amplificado. El producto amplificado se analiza mediante una electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y visualización posterior en un transiluminador. Ello permite comprobar el tamaño del fragmento amplificado (123 pb) por comparación con un marcador de peso molecular y con un control positivo de amplificación.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica (Procedimiento 10). Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC, 2000.

Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01). SEIMC, 2003.

Procedimientos específicos mencionados en la bibliografía (punto 12).

4. MUESTRAS

Cualquier tipo de material clínico que pueda contener micobacterias. Hasta la fecha los mejores resultados con técnicas de amplificación genómica se han

conseguido con muestras de origen respiratorio. La extracción de ácidos nucleicos de las muestras clínicas debe hacerse, preferiblemente, una vez que hayan sido homogeneizadas y concentradas con el pretratamiento habitual.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. REACTIVOS PARA LA AMPLIFICACIÓN (VOLUMEN: 50 µL).

- KCl 50mM
- Tris-HCl 10 mM, pH= 8,3
- MgCl₂ 1,5 mM
- Gelatina 100 µg/ml
- dNTPs 200 µM (cada uno de ellos)
- *Taq* polimerasa 2,5 Unidades
- *Primers* 0,5 µmol (de cada uno de ellos)
 - IS-1: 5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG
 - IS-2: 5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG

5.2. REACTIVOS PARA LA ELECTROFORESIS

- Tampón TBE 1x (Tris-HCl 100 mM, ácido bórico 90 mM, Na₂EDTA·2H₂O 1 mM; pH= 8,3).
- Tampón de carga para electroforesis (azul de bromofenol 0,25%, cianol xileno FF 0,25%, glicerol 30%).
- Marcador de peso molecular (intervalo: 50-1.000 pb)
- Agarosa.
- Bromuro de etidio (10 mg/ml).
- Agua destilada.
- Papel parafinado

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de Seguridad Biológica de clase IIA o IIB3.
- Centrífuga de Seguridad biológica.
- Microcentrífuga.
- Nevera (2-8°C).
- Congelador (-20°C).
- Termociclador.
- Vórtex.
- Bloque calefactor.
- Baño térmico.
- Fuente de alimentación para electroforesis convencional.
- Cubetas de electroforesis.
- Transiluminador de UV.
- Equipo fotográfico.
- Tubos tipo Eppendorf 1,5 ml y 0,2 ml.
- Asas bacteriológicas estériles.
- Gradillas de diferentes formatos.
- Bloques de frío (hielo).
- Micropipetas de diferentes volúmenes
- Puntas de pipeta provistas de filtro a prueba de aerosoles.
- Pipetas Pasteur de plástico estériles.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección directa de <i>M. tuberculosis</i> mediante amplificación genética (PCR)	PNT-BK-08	
		Edición Nº 01	Página 3 de 4

7. PROCESAMIENTO

El procesamiento de las muestras se inicia con el pretratamiento habitual del laboratorio de micobacterias descrito en el PNT correspondiente (PNT-BK-02). Una vez finalizado el mismo se reservará una alícuota del material concentrado equivalente en volumen al utilizado para inocular los cultivos y que puede ser congelado hasta su utilización.

7.1. EXTRACCIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

- Centrifugar 500 µl de la muestra clínica (concentrada después del pretratamiento habitual) a 13.000 rpm durante 10 min.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 400 µl de tampón TE 1x (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM, pH= 8) y agitar (vórtex).
- Calentar las muestras en bloque térmico a 95°C durante 15 min.
- Añadir 50 µl de lisozima (10 mg/ml), agitar (vórtex) e incubar 1 h a 37 °C.
- Añadir 70 µl de SDS 10% y 6 µl de proteinasa K (10 mg/ml), agitar (vórtex) e incubar a 65°C durante 10 min.
- Añadir 100 µl de NaCl 5M y agitar (vórtex).
- Añadir 80 µl de solución CTAB-NaCl (10% N-cetyl-N,N,N-trimethyl ammonium bromide, 0,73M NaCl), agitar (vórtex) e incubar a 65°C 10 min.
- Añadir 706 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v) y agitar en el vórtex 10 s.
- Centrifugar 5 min a 13.000 rpm.
- Aspirar el sobrenadante y añadir 0,6 volúmenes de 2-propanol, mantener la mezcla 30 min a -20°C.
- Centrifugar 15 min a 13.000 rpm.
- Desechar el sobrenadante con cuidado.
- Añadir 1 ml de etanol 70% frío.
- Centrifugar 5 min a 13.000 rpm.
- Desechar el sobrenadante con cuidado y resuspender con 100 µl de agua destilada estéril.

7.2. AMPLIFICACIÓN

- Se inocularán 50 µl del producto de la extracción de cada muestra en los viales de amplificación correspondientes (volumen final 100 µl)
- *Programa de termociclación*: desnaturalización (75 s a 94°C), alineamiento/extensión (3 min a 68°C). Nº de ciclos: 25.

7.3. ELECTROFORESIS

- En gel de agarosa al 2%. Electroforesis a 100-120V el tiempo necesario para que el frente de migración haya avanzado un mínimo de 4 o 6 centímetros desde el pocillo.
- Observar en el transiluminador. El fragmento amplificado tiene 123 pb.

7.4. CONTROL DE CALIDAD

- Deben establecerse etiquetados y controles de caducidad de los reactivos y soluciones de biología

molecular, de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes o de la literatura.

- Deben emplearse controles internos tanto para monitorizar la eficacia de la fase de extracción como para detectar la presencia de inhibidores de la reacción de amplificación. El ideal se basa en utilizar un control negativo y un control positivo.
- Para una lectura adecuada de los resultados en la electroforesis deben incluirse marcadores de peso molecular adecuados.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Se considerarán positivas aquellas muestras que presentan el fragmento amplificado al mismo nivel de migración que el control positivo de amplificación. El tamaño se confirma mediante comparación con el marcador de peso molecular. El control negativo no debe presentar ningún tipo amplificación (banda).
- Los resultados obtenidos se registraran en los impresos para tal efecto, así como en la base de datos del programa de gestión del laboratorio. Tanto los resultados a nivel informático como los que precisen ser informados por papel deberán ser revisados y validados por el facultativo responsable.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del Laboratorio de Micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. En el caso de las micobacterias deberán seguirse las normas básicas de protección frente a los agentes biológicos del grupo 3.

En las técnicas de biología molecular y especialmente de amplificación genómica existen diversos aspectos estructurales y de praxis técnica que deberán tener en cuenta. Estructuralmente se precisan tres zonas o áreas diferentes dentro del laboratorio: 1) La denominada "zona limpia" donde se prepararán los reactivos; 2) La zona para la preparación de la muestra (pretratamiento habitual, fase de extracción e inoculación de los viales de amplificación previamente preparados); y 3) el área para el manejo del material amplificado (fase de detección). Como recomendación general, deberán evitarse, en lo posible las manipulaciones innecesarias y extremarse las precauciones tanto en

Servicio de Microbiología Hospital.....	Detección directa de <i>M. tuberculosis</i> mediante amplificación genética (PCR)	PNT-BK-08	
		Edición Nº 01	Página 4 de 4

lo referente al manejo de las muestras como a la dispensación de los reactivos.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La extracción del ADN puede ser difícil en estas bacterias. Por otro lado, existen algunos aislamientos que carecen o poseen escasas copias del fragmento IS6110. Todo ello contribuye, junto a la posible inhibición de la amplificación, a los resultados falsos negativos. Al contrario, la contaminación cruzada con ADN justificaría parte de los resultados falsos positivos de la técnica. Además, hay que recordar que el ADN micobacteriano puede detectarse durante varias semanas una vez iniciado el tratamiento específico, en ausencia de cultivos positivos. Por ello la PCR no es una técnica válida para el seguimiento clínico de los pacientes en tratamiento.

El diagnóstico de tuberculosis mediante PCR complementa al examen microscópico y al cultivo de micobacterias, pero no los sustituye. En la actualidad el cultivo sigue siendo el método de referencia ("gold standard"). Por ello, cuando la cantidad de muestra recibida sea insuficiente para todos los procedimientos solicitados, deberá darse prioridad a los métodos convencionales frente a los moleculares. En cuanto a los "métodos caseros de amplificación", existe bastante experiencia al respecto, donde se advierte de la gran variabilidad de los resultados obtenidos entre los diferentes laboratorios. La dificultad en la comparación de los datos radica en los diversos protocolos utilizados y la falta de estandarización de los mismos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Eisenach, K.D., M.D. Cave, J.H. Bates, and J.T. Crawford. 1990. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*, J. Infect. Dis. 161:977-981.
2. Hoorfar, J., B. Malorny, A. Abdulmawjood, N. Cook, M. Wagner, and P. Fach. 2004. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. J. Clin. Microbiol. 42:1863-1868.
3. Leven, M., and H. Goossens. 1997. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. Clin. Microbiol. Rev. 10:242-256.
4. Noordhoek, G.T., J.D. van Embden, and A.H. Kolk. 1996. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. J. Clin. Microbiol. 34:2522-2525.
5. Nucleic acid amplification technologies: application to disease diagnosis. 1997. H.H. Lee, S.A. Morse, Ø. Olsvik (eds.). BioTechniques Books. Eaton Publishing, USA.
6. Thierry, D., A. Brisson-Noël, V. Vincent-Lévy-Frébault, S. Nguyen, J.L. Guesdon, and B. Gicquel. 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis, J. Clin. Microbiol. 28:2668-2673.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Método de las proporciones en agar)	PNT-BK-09	
		Edición Nº 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es definir la metodología para la realización de las pruebas de sensibilidad en *M. tuberculosis* frente a antibióticos de primera y segunda línea en medio de cultivo sólido con agar. Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de hospitales y centros de salud con capacidad para realizar las técnicas de cultivo de micobacterias, que posean las instalaciones adecuadas y la experiencia y entrenamiento suficiente para garantizar la validez de los resultados. Cada laboratorio debe establecer la conveniencia de su realización atendiendo a sus dotaciones y a su estrategia de gestión.

2. FUNDAMENTO

Las pruebas de sensibilidad en *M. tuberculosis* deben realizarse en todos los aislamientos primarios de cada nuevo paciente, cuando se indiquen retratamientos, ante fracasos clínicos y cuando se sospeche resistencia. Existen tres métodos distintos de interpretación y realización del estudio de sensibilidad, aunque el más utilizado es el de las proporciones descrito por Canetti y Grosset, en el que se estudian determinadas concentraciones de antibióticos frente a dos diluciones distintas del inóculo bacteriano. Los antibióticos frente a los que se considera que su utilidad está probada son: isoniacida, rifampicina, etambutol, estreptomycin, kanamicina, etionamida y capreomicina. Los resultados son inconsistentes para cicloserina y presentan algunas dificultades para pirazinamida. Puede realizarse directamente a partir de muestras con baciloscopia positiva o a partir de aislamientos crecidos en cultivo. Los antibióticos pueden diluirse en el agar durante la preparación del medio o pueden utilizarse discos de forma similar al método disco/placa de Kirby-Bauer utilizado frente a otras bacterias.

El protocolo que se describe en este documento se basa en la utilización del método de las proporciones, con medio de agar Middlebrook 7H10 frente a concentraciones críticas de los antibióticos mencionados (excepto pirazinamida y cicloserina), incluidos en el agar por dilución, utilizando placas partidas en dos y a partir de aislamientos de cultivo.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica (procedimiento 10). Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC 2000.

Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología (PNT-RTP-01). SEIMC 2003.

Procedimientos específicos mencionados en la bibliografía (punto 12).

4. MUESTRAS

Aislamientos de cultivo de las primeras muestras obtenidas antes de iniciar el tratamiento o tras el

retratamiento. Deben utilizarse resiembras en cultivo puro y de no más de un mes de crecimiento.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Medio de cultivo Middlebrook 7H10 y 7H9.
- Medio de cultivo agar Sangre.
- Suplemento OADC.
- Glicerol.
- DMSO.
- Metanol.
- Agua destilada estéril.
- Soluciones de stock de los antibióticos a concentración de 1.000 µg/ml, obtenidos de presentaciones comerciales o de los laboratorios farmacéuticos fabricantes.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica IIA o IIB3.
- Centrífuga con sistema de cierre de seguridad.
- Agitador vórtex
- Hornillo o agitador magnético con bloque térmico.
- Barras magnéticas.
- Placas de Petri estériles con 2 o 4 cuadrantes.
- Estándar de densidad Macfarland nº 1 o nefelómetro.
- Perlas de vidrio estériles.
- Pipetas Pasteur estériles, de cristal o de plástico.
- Pipetas calibradas estériles, de 1, 5 y 10 ml.
- Puntas de pipeta semiautomática estériles.
- Filtros antibacterianos desechables, estériles y con poro de 0,22 µm.

7. PROCESAMIENTO

7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

7.1.1. Preparación de las soluciones de antibióticos

- Preparar una solución de stock de 2000 µg/ml de cada uno de los antibióticos. Las concentraciones finales a estudiar se indican en la tabla a continuación.
- Para preparar las soluciones de stock se utilizará agua destilada en la mayoría de antibióticos. La rifampicina se diluye con DMSO o metanol, agregando la mínima cantidad posible hasta conseguir la disolución. Para el resto del volumen diluyente se utiliza agua destilada. En la preparación de etionamida se utiliza DMSO.
- Después de filtrar las soluciones de stock, preparar alícuotas estériles de 1 ml. Pueden conservarse hasta 12 meses a -20°C o más tiempo a -80°C.
- Las alícuotas deben estar convenientemente rotuladas indicando el nombre del antibiótico, la concentración de stock y la fecha de preparación.
- Una vez descongeladas no deben reutilizarse.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Método de las proporciones en agar)	PNT-BK-09	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

7.1.2. Preparación del medio de cultivo

- Pesarse medio 7H10 deshidratado suficiente para 1.700 ml de agua destilada, siguiendo las recomendaciones del fabricante.
- Mezclar cuando el agua esté a 50-60°C utilizando un agitador magnético o un hornillo.
- Continuar calentando hasta que la mezcla sea homogénea y el medio de cultivo adquiera un color más transparente (aproximadamente 20 min).
- Añadir 8,5 ml de glicerol (0,5 ml/100 ml), mezclar y calentar 3 min más.
- Repartir 180 ml de medio en 8 matraces de 500 ml y añadir una barra magnética a cada uno de ellos.
- Cubrir los matraces con un tapón a rosca o con papel de aluminio y autoclavar durante 15 min a 121°C.
- Dejar enfriar el medio a 50-56°C y añadir 20 ml de OADC a cada matraz.
- Añadir las soluciones de antibiótico a cada matraz según lo especificado en la tabla y mezclar.
- Rotular las placas con las iniciales y concentraciones de los antibióticos, así como la fecha de preparación. Llenar las dos mitades con el contenido del mismo matraz. Dejar enfriar.
- El medio de cultivo preparado será adecuado para 9-10 placas de cada concentración y del medio de cultivo sin antibiótico.
- Incubar las placas durante una noche para descartar contaminación durante la preparación.
- Almacenar las placas preparadas a 4°C, en bolsas de plástico separadas por antibióticos. Utilizar en el plazo de un mes (Tabla 1).

7.1.3. Preparación del inóculo

- Preparar una suspensión n° 1 McFarland, utilizando caldo de Middlebrook 7H9, perlas de cristal y tubos con tapón a rosca. Deben tomarse colonias representando todos los posibles tipos presentes en el cultivo.
- Alternativamente puede prepararse una suspensión menos densa e incubarla durante 3-5 días hasta alcanzar la densidad 1 McFarland.
- Diluir la suspensión a 10^{-2} y a 10^{-4} utilizando 7H9 o agua destilada.

7.1.4. Inoculación e incubación

- Para cada cepa a estudiar preparar las placas de los antibióticos de interés, añadiendo una sin antibiótico que será usada como control.
- Se inoculará cada concentración de antibiótico con las dos diluciones de inóculo, de manera que en una misma placa estarán ambas diluciones de inóculo y la misma concentración de antibiótico.
- Inocular 50 µl de cada suspensión en cada hemiplaca. Extender con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril y doblada en L. Dejar secar el inóculo, sin extraer las placas de la cabina de seguridad (aproximadamente una hora).
- Inocular placas de agar sangre con ambas diluciones del inóculo para comprobar la esterilidad.
- Empaquetar en bolsas de polietileno, permeables a CO₂ e incubar a 37°C en atmósfera de CO₂, durante 3 semanas.

7.2. CONTROL DE CALIDAD

- Está recomendado utilizar la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294).
- Esta cepa debe ser estudiada cada vez que se utilice un nuevo lote de medio de cultivo preparado.
- La cepa de control debe ser sensible a todos los antibióticos de primera y segunda línea, siguiendo los mismos criterios de interpretación aplicados a las cepas problema.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Examinar las placas de agar sangre de control de esterilidad durante el primer y segundo día de incubación. Si se detecta crecimiento de bacterias contaminantes, desechar la prueba de sensibilidad.
- Examinar las placas de 7H10 sin antibiótico semanalmente. Cuando se observe crecimiento en la dilución 10^{-4} pueden leerse las placas con antibiótico.
- Si no se observa crecimiento adecuado en 3 semanas de incubación, debe repetirse la prueba de sensibilidad.

Tabla 1.

Antibiótico	Conc. Final µg/ml	Vol. Sol. Stock (µl)	H ₂ O diluyente de sol. stock (µl)	Vol. medio cultivo (ml)
Isoniacida	0,2	20	980	200
	1	100	900	200
Etambutol	5	500	500	200
	10	1000	0	200
Estreptomicina	2	200	800	200
	10	1000	0	200
Etionamida	5	500	500	200
Capreomicina	10	1000	0	200
Kanamicina	5	500	500	200

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Método de las proporciones en agar)	PNT-BK-09	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

- Interpretar el resultado final a las 3 semanas de incubación. Para ello debe efectuarse un recuento de las colonias crecidas en las dos diluciones del control sin antibiótico y en las diluciones con antibiótico.
- Las colonias deben ser contables en una de ambas diluciones de la placa control. Idealmente en la dilución 10^{-4} deberá haber entre 50 y 200 colonias.
- Si en la dilución 10^{-4} hay 50 colonias o más, el resultado debe interpretarse con este recuento.
- Si en la dilución 10^{-4} hay menos de 50 colonias, el resultado puede interpretarse con la dilución 10^{-2} siempre que en ésta haya más de 50 colonias.
- Si en ambas diluciones hay incontables colonias y en las placas con antibiótico no se observa crecimiento, puede interpretarse que la cepa es sensible. Si se observa crecimiento en alguna de ellas, debe repetirse todo la prueba.
- Cuando se observe crecimiento en las placas con antibiótico, se determinará el porcentaje de colonias en relación al control. Cuando se observe crecimiento igual o superior al 1% se considerará la cepa resistente a la concentración estudiada.
- Si se observa crecimiento de microcolonias en una placa con antibiótico, deben contabilizarse. Posiblemente indican resistencia de menor nivel.
- Los resultados deben exponerse con las concentraciones estudiadas y la interpretación se categorizará como de sensible o resistente para cada una de ellas. Cuando se utilicen dos concentraciones del mismo antibiótico y únicamente sea resistente a la inferior, sería aconsejable añadir un comentario parecido al siguiente: "Los resultados señalan resistencia de bajo nivel a.....Indica que el paciente puede seguir beneficiándose de la utilización de este fármaco en su tratamiento"

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. En el caso de las micobacterias deberán seguirse las normas básicas de protección frente a los agentes biológicos del grupo 3. Por ello, todos los pasos de la técnica se deben realizar en una cabina de seguridad biológica clase IIA o IIB3, utilizando bata, guantes y mascarilla de uso exclusivo.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El método descrito no es totalmente adecuado para determinar la sensibilidad a la pirazinamida, para la que se recomienda utilizar el método radiométrico como técnica de referencia. Asimismo, en los últimos años se están utilizando antibióticos, como algunas fluoroquinolonas, amicacina o rifabutina, frente a los cuales no se ha validado la técnica.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Della-Latta, P. 2004. Mycobacteriology and antimycobacterial susceptibility testing. *In*: H.D. Isenberg (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology, Washington D.C.
3. Inderlied CB and Pfyffer GE, 2003. Susceptibility test methods: Mycobacteria, p. 1149-1177. *In*: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
4. Master, R.N. 1995. Mycobacteriology p. 3.0.1-3.16.4. *In*: H.D. Isenberg (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; Approved Standard. Document M24-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad de <i>Mycobacterium kansasii</i> mediante el sistema BACTEC 460	PNT-BK-10	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la realización de las pruebas de sensibilidad *in vitro* de *Mycobacterium kansasii* a los fármacos de primera línea mediante el sistema radiométrico BACTEC 460.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica de referencia que posean la dotación y experiencia adecuada para el manejo de estos microorganismos y sustancias radiactivas, así como las técnicas para la determinación de la sensibilidad *in vitro* de los mismos.

2. FUNDAMENTO

Las pruebas de sensibilidad a los fármacos mediante el sistema BACTEC 460 se basan en una modificación del método de las proporciones. El caldo de cultivo de los viales de BACTEC contiene ácido palmítico marcado con ¹⁴C como sustrato nutritivo. El carbono es utilizado por la micobacteria, desprendiéndose como producto de su metabolismo ¹⁴CO₂ a la fase aérea del vial que es detectado cuantitativamente por el BACTEC 460. El instrumento lo expresa como un índice de crecimiento (IC) ya que la cantidad liberada de ¹⁴CO₂ es proporcional al crecimiento obtenido. El sistema BACTEC utiliza viales con concentraciones críticas de los distintos antibióticos y un vial de control sin antibiótico. Después de ajustar el inóculo adecuadamente se siembran los frascos con antibióticos, mientras que el número de microorganismos añadidos al medio de control (sin antibiótico) está 100 veces diluido. Los viales inoculados se incuban y posteriormente se realiza una lectura diaria, evaluando el gradiente de los índices de crecimiento (IC) del control comparados con los diversos gradientes de los IC de los viales con antibióticos. Si el gradiente de los viales con antibióticos es menor que el del control, la cepa se considera sensible; cuando el gradiente es mayor que el del control, la cepa se considera resistente, ya que existiría más de un 1% de mutantes resistentes.

El protocolo más adecuado es el de "la lectura diaria". Así, durante todos los días del año, incluidos los fines de semana y días festivos, se lleva a cabo la lectura ininterrumpida de los viales del BACTEC. Los fármacos a estudiar son fundamentalmente: estreptomycin (S), isoniacida (I), rifampicina (R) y etambutol (E).

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica (procedimiento 10). Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC, 2000.

Procedimientos específicos mencionados en la bibliografía (punto 12).

4. MUESTRAS

Cualquier cultivo sólido (Löwenstein-Jensen, 7H10 ó 7H11 de Middlebrook) o líquido (7H9 de Middlebrook o BACTEC 12B) con un crecimiento puro de *M. kansasii* de no más de 4 semanas.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Viales BACTEC 12B (medio de cultivo). Conservar a temperatura ambiente.
- Fluido para dilución BACTEC o DF (BACTEC DILUTING FLUID). Se deben conservar entre 2 y 25°C.
- Equipo farmacológico BACTEC S.I.R.E. (BACTEC S.I.R.E. DRUG KIT) para la prueba de sensibilidad a la estreptomycin, isoniacida (bajas concentraciones), rifampicina y etambutol. El equipo o kit se compone de viales de cristal con los antibióticos liofilizados.
- Sustancia valorada de hidracida del ácido isonicotínico (isoniacida).
- Alcohol de 70°.
- Placas de agar sangre o chocolate.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica clase IIA o IIB3.
- Sistema de lectura radiométrico BACTEC 460.
- Incubador de 37 ± 2°C con CO₂.
- Incubador de 30 ± 2°C.
- Agitador rotatorio Vórtex.
- Aguja y jeringuilla estériles de 1 y 5 ml.
- Asas bacteriológicas estériles.
- Nefelómetro.
- Tubos de cristal con bolitas estériles.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Micropipetas de 100 µl.
- Algodón o gasas.

7. PROCESAMIENTO

7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

7.1.1. Preparación de las soluciones de antibióticos

- Preparar las soluciones de trabajo de estreptomycin, rifampicina y etambutol. Tras retirar las tapas de plástico, se deberán desinfectar los tapones de goma con alcohol de 70°. Dejar secar y añadir 5 ml ó 10 ml de agua estéril a cada vial con antibiótico liofilizado del equipo SIRE según la tabla del anexo 1. Mezclar suavemente hasta su completa disolución.
- Preparar las soluciones de trabajo de isoniacida: A) Bajas concentraciones: tras retirar las tapas de plástico, se deberán desinfectar los tapones de goma con alcohol de 70°. Dejar secar y añadir en cada vial, con la isoniacida liofilizada del equipo SIRE, 5 ml de agua estéril para una concentración de 0,1 µg/ml, y 1,25 ml de agua estéril para una concentración de 0,4 µg/ml. Mezclar suavemente hasta su completa disolución; B) Altas concentraciones (1, 5 y 10 µg/ml) se preparan a partir de sustancia valorada de isoniacida. Se preparará una solución stock o madre a una concentración de 4.000 µg/ml. A partir de la misma se realizarán diluciones con agua estéril para obtener las concentraciones de trabajo deseadas (Anexo 1).

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad de <i>Mycobacterium kansasii</i> mediante el sistema BACTEC 460	PNT-BK-10	
		Edición Nº 01	Página 3 de 4

- De las soluciones de trabajo y stock se realizarán alícuotas de 100 µl en tubos de microcentrífuga mediante una pipeta.
- Las alícuotas de cada fármaco deberán conservarse a -20°C hasta 3 meses o a -70°C hasta 6 meses, en cajas de congelación (criobox) independientes para cada antimicrobiano.
- Una vez que se descongelan las alícuotas para la realización de una prueba de sensibilidad, se deberán utilizar en las primeras 24 horas y mantendrá el antibiótico en el frigorífico (2-8°C) si no se van a usar inmediatamente.

7.1.2. Preparación del inóculo

- Realizar un subcultivo en un vial BACTEC 12B a partir de un cultivo puro del aislamiento a estudiar. Para ello se deberá desinfectar el tapón de goma con alcohol de 70° y añadir 0,1 ml de uno de los siguientes orígenes:
 - a) Vial Bactec 12B con un IC entre 500 y 999.
 - b) Medio líquido con una turbidez 1 de McFarland.
 - c) Suspensión con una turbidez 1 de McFarland a partir de un medio sólido mediante suero fisiológico en un tubo con bolitas de cristal.
- Incubar a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ en completa oscuridad.
- Realizar una lectura diaria del vial subcultivado mediante el BACTEC 460 hasta que el índice de crecimiento (IC) se encuentre entre 250 y 499.
- En el caso de que el IC sea superior a 500, se continuará incubando hasta el primer día que el IC sea de 999. Realizar una dilución 1:20 con DF, añadiendo 0,5 ml de la suspensión en 9,5 ml de DF.
- No se deberán utilizar los cultivos de BACTEC 12B, pasadas 24 h desde que se haya alcanzado el IC máximo (IC >999).

7.1.3. Inoculación e incubación

- Para cada prueba de sensibilidad se utilizará, como control, un vial BACTEC 12B sin antibiótico, y uno para cada fármaco o concentración antibiótica elegida.
- Preparar los viales BACTEC 12B quitando las tapas de plástico y desinfectando la goma del tapón con alcohol de 70°C. Antes de la inoculación los viales se pasarán por el lector BACTEC 460. Aquellos que den un IC superior o igual a 20 se desecharán. Los frascos válidos se deberán rotular adecuadamente.
- Tras volver a desinfectar el tapón de goma de cada vial, dispensar asépticamente 0,1 ml de cada alícuota de antibiótico a su vial de BACTEC 12B correspondiente.
- Inocular asépticamente 0,1 ml de la suspensión bacteriana en los viales con antibiótico. En el vial de control (C+) se añadirán 0,1 ml de una dilución 1:100 (en el vial DF) de la suspensión bacteriana.
- *Nota:* Debido a la resistencia habitual de *M. kansasii* a bajas concentraciones de isoniazida, se podrían estudiar sólo dos concentraciones: 1 y 5 µg/ml. En el

caso de que la cepa presentara resistencia a 5 µg/ml, habría que realizar la prueba a 10 µg/ml.

7.2. CONTROL DE CALIDAD

- Para descartar una posible *contaminación* bacteriana o fúngica, incluidos los cultivos mixtos, se deberá sembrar a partir del inóculo una placa de agar sangre o chocolate e incubarla a 35-37°C durante 72 h.
- Es aconsejable utilizar una cepa de control con los lotes nuevos de cada antimicrobiano a estudiar. La cepa de referencia *M. kansasii* ATCC 12478 es sensible a los antimicrobianos de primera línea activos frente a este microorganismo. En especial, la rifampicina, que es el antimicrobiano más importante de estudio en esta especie, cuya concentración crítica es de 1 µg/ml. Por otro lado, hay que tener en cuenta que *M. kansasii* presenta una sensibilidad disminuida a la isoniazida en comparación con *M. tuberculosis*. Las concentraciones críticas para este fármaco deberán ser ≥ 1 µg/ml.

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- La lectura se realizará de forma diaria y a la misma hora (± 2 h), incluidos los fines de semana y festivos.
- Los resultados se interpretarán cuando el índice de crecimiento (IC) sea superior o igual a 30 en el vial de control (C+) y no exista crecimiento bacteriano (no micobacteriano) y/o fúngico en la placa de control de esterilidad.
- Se deberán realizar un mínimo de 4 lecturas (5 días de incubación) para una correcta interpretación.
- Si el IC del C+ es ≥ 30 entre el día 1 y el 2, el inóculo será demasiado elevado teniendo que repetir la prueba.
- Si el IC del C+ no llega a 30 en los primeros 14 días de incubación, la prueba no se podrá interpretar por un inóculo escaso y se deberá repetir.
- Cuando la interpretación de los resultados se puede llevar a cabo, se realizará el cálculo de la diferencia de los IC (ΔIC) del día previo y el actual, para el C+ y los viales con antibióticos:
 - $\Delta\text{IC del C+} > \Delta\text{IC del vial con antibiótico} =$ SENSIBLE.
 - $\Delta\text{IC del C+} < \Delta\text{IC del vial con antibiótico} =$ RESISTENTE.
 - $\Delta\text{IC del C+} \approx \Delta\text{IC del vial con antibiótico} =$ Límite o parcialmente resistente.
- Si el IC de los viales con fármacos excede el 500 y continúa > 500 al día siguiente, se interpretará como resistente, independientemente del ΔIC , siempre que no hayan sido sobreinoculados, es decir, que el IC del C+ no sea > 30 en los tres primeros días.
- Cuando se obtengan resultados límites, los viales se deberán leer 2 ó 3 días más.
- Los resultados de sensibilidad o resistencia se registrarán en los impresos para tal efecto, así como en la base de datos del programa de gestión

Servicio de Microbiología Hospital.....	Pruebas de sensibilidad de <i>Mycobacterium kansasii</i> mediante el sistema BACTEC 460	PNT-BK-10	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

del laboratorio. Todos los resultados deberán ser revisados y validados por el facultativo responsable.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. En el caso de las micobacterias deberán seguirse las normas básicas de protección frente a los agentes biológicos del grupo 3. Aunque *M. kansasii* sea un agente de nivel 2, hay que recordar que se desconoce casi todo acerca de su transmisibilidad y no deja de ser un microorganismo con una elevada capacidad patógena. Por este motivo, se aconseja realizar todos los pasos de preparación del inóculo y siembra de la técnica en una cabina de seguridad biológica clase IIA o IIB3, utilizando bata, guantes y mascarilla de uso exclusivo. El BACTEC 460 requiere los permisos y condiciones necesarios para toda instalación radiactiva. Por ello, deberá ubicarse en una zona reservada y correctamente indicada, además de realizarse las supervisiones recomendadas.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

En determinadas ocasiones es difícil obtener un inóculo adecuado que permita una interpretación correcta. Además, no existe un total consenso sobre las concentraciones críticas y su correlación clínica.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Inderlied, C.B., and G.E. Pfyffer. 2003. Susceptibility Test Methods: Mycobacteria, p. 1149-1177. In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Inderlied, C. B., and K. A. Nash. 1996. Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing, spectra of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biologic fluids, p. 127-175. In V. Lorian (ed.), Antibiotics in laboratory medicine. 4th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Heifets, L. B. 1991. Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infection. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Master, R.N. 1995. Mycobacteriology p. 3.0.1-3.16.4. In: H.D. Isenberg (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; Approved Standard. Document M24-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Siddiqi, S. H. 1995. BACTEC 460 TB System. Product and procedure manual, revision D. Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md.

Anexo 1. Concentraciones de los fármacos de primera línea utilizados en las pruebas de sensibilidad de *M. kansasii* mediante el sistema BACTEC 460

Antibiótico	Dilución	Concentración solución de trabajo (µg/ml) ^a	Volumen (ml) para añadir a los viales BACTEC 12B	Concentración final en el vial BACTEC (µg/ml)
Estreptomina ^b	Añadir 5 ml agua estéril	240	0,1	6
Rifampicina ^b	Añadir 10 ml agua estéril	40	0,1	1
Etambutol ^b	Añadir 5 ml agua estéril	300	0,1	7,5
Isoniacida Liofilizada ^b	Añadir 5 ml agua estéril	4	0,1	0,1
Isoniacida Liofilizada ^b	Añadir 1,25 ml agua estéril	16	0,1	0,4
Solución Stock (4.000 µg/ml) ^c	Dilución 1:100 con agua estéril	40	0,1	1
Solución Stock (4.000 µg/ml) ^c	Dilución 1:20 con agua estéril	200	0,1	5
Solución Stock (4.000 µg/ml) ^c	Dilución 1:10 con agua estéril	400	0,1	10

^a Alícuotas de 0,1 ml en viales de microcentrifuga tipo eppendorf.

^b Viales de estreptomina, rifampicina, etambutol e isoniacida liofilizadas del Kit SIRE de BACTEC.

^c Se parte de sustancia valorada de hidracida del ácido isonicotínico (mínimo 99%).

Servicio de Microbiología Hospital.....	Prueba de sensibilidad en micobacterias de crecimiento rápido mediante microdilución en caldo	PNT-BK-11	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir la metodología para la realización de la prueba de sensibilidad *in vitro* de las micobacterias de crecimiento rápido (MCR) a distintos antimicrobianos, mediante la técnica de microdilución en caldo.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de microbiología clínica de referencia que posean la dotación y experiencia adecuada para el manejo de estos microorganismos y las técnicas de determinación de la sensibilidad *in vitro* de los mismos.

2. FUNDAMENTO

Aunque existen múltiples técnicas que pueden ser utilizadas, tan sólo la técnica de microdilución en caldo ha sido aprobada por el NCCLS y es, en la actualidad, el método de referencia. Esta prueba de sensibilidad determina la CIM (concentración inhibitoria mínima) de distintos antimicrobianos y, se basa en el método de microdilución en caldo estándar, recomendado para las bacterias aerobias convencionales. El caldo base es un Mueller-Hinton, al que se le añaden los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de estos microorganismos. Por ello, debe contener cationes como Ca^{2+} (20-25 mg/l) y Mg^{2+} (10-12,5 mg/l), así como un pH de 7,2-7,4. El procedimiento deberá realizarse en los aislamientos clínicos de *Mycobacterium fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. abscessus* y cualquier micobacteria no pigmentada de crecimiento rápido con significación clínica.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica (procedimiento 10). Procedimientos en microbiología clínica. SEIMC, 2000.

Procedimientos específicos mencionados en la bibliografía (punto 12).

4. MUESTRAS

Cualquier cultivo micobacteriano en medio sólido (Löwenstein-Jensen, 7H10 o 7H11 de Middlebrook) con un crecimiento puro de MCR no pigmentada de no más de 7-10 días.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Caldo de Mueller-Hinton suplementado con cationes y 0,02% de Tween 80.
- Medio líquido de TSB (alternativo).
- Solución salina (0,85% NaCl) estéril (alternativo).
- Agua estéril.
- Sustancia valorada de los antimicrobianos: amicacina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem, sulfametoxazol, tobramicina.
- Placas de agar con sangre de carnero.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica clase IIA o IIB3.
- Incubador de $37 \pm 2^{\circ}C$ con CO_2 .
- Incubador de $30 \pm 2^{\circ}C$.

- Placas de microtitulación o microtiter de 96 pocillos con fondo redondeado en "U".
- Agitador rotatorio Vórtex.
- Nefelómetro.
- Tubos de con bolitas de cristal estériles.
- Asas bacteriológicas estériles.
- Tubos de plástico de 50 ml tipo Falcon.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Escobillones o torundas estériles.
- Micropipetas de volumen variable uni y multicanal.
- Puntas de micropipetas con filtro estériles.

7. PROCESAMIENTO

7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

7.1.1. Preparación de las soluciones de antibióticos

- A partir de la sustancia valorada de cada antimicrobiano, se preparará una *solución stock* o *madre* con los solventes y diluyentes recomendados por los fabricantes a una concentración elevada (1.000-10.000 $\mu g/ml$) para su conservación. Se realizarán alícuotas en viales de polipropileno o polietileno. La *solución madre* podrá permanecer estable a $-70^{\circ}C$ durante al menos 6-12 meses.
- A partir de la *solución stock* o *madre* se realizarán diluciones con agua estéril para obtener las *concentraciones de trabajo* deseadas: amicacina (1 a 128 $\mu g/ml$), cefoxitina (2 a 256 $\mu g/ml$), ciprofloxacino (0,12 a 16 $\mu g/ml$), claritromicina (0,06 a 64 $\mu g/ml$), doxiciclina (0,25 a 32 $\mu g/ml$), imipenem (1 a 64 $\mu g/ml$), sulfametoxazol (1 a 64 $\mu g/ml$) y tobramicina (1 a 32 $\mu g/ml$, sólo valorable para *M. chelonae*).
- Una vez que se preparan las *concentraciones de trabajo*, se deberán utilizar en las primeras 24 horas y se mantendrá el antibiótico en el frigorífico ($2-8^{\circ}C$) si no se van a usar inmediatamente.

7.1.2. Preparación de las placas de microdilución

- En cada placa de microtitulación hay 96 pocillos (12x8) y, por tanto, para cada aislamiento se pueden estudiar hasta 12 diluciones de cada uno los 8 antimicrobianos mencionados. No obstante, no suelen hacer falta tantas diluciones y algunos de los pocillos pueden reservarse para el control positivo de crecimiento (sin antibiótico) y negativo de esterilidad (sin inóculo).
- Añadir con una pipeta multicanal 100 μl de caldo de Mueller-Hinton ajustado con cationes en cada pocillo, salvo la primera columna de pocillos correspondiente a la concentración más elevada de cada antimicrobiano.
- Dispensar en cada pocillo vacío 200 μl de la dilución más elevada de cada antimicrobiano. A partir de éste se realizarán diluciones a la mitad, traspasando 100 μl al siguiente pocillo en la fila del mismo antimicrobiano.
- En el pocillo de control de crecimiento y en el de control de esterilidad no se añadirá antibiótico alguno.
- Es recomendable inocular las placas lo antes posible.

7.1.3. Preparación del inóculo

- Sembrar el aislamiento micobacteriano en una placa de agar sangre e incubar a $30^{\circ}C$ durante 3-5 días en atmósfera aerobia normal.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Prueba de sensibilidad en micobacterias de crecimiento rápido mediante microdilución en caldo	PNT-BK-11	
		Edición Nº 01	Página 3 de 4

- A partir del crecimiento en agar sangre y con un escobillón, se preparará una suspensión en agua destilada de una turbidez equivalente al 0,5 de McFarland usando un nefelómetro ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Alternativamente, se pueden transferir 3-5 colonias de la placa de agar sangre a un tubo con caldo de Mueller-Hinton (con Tween 80) o TSB y bolitas; incubar a 30 °C durante 1-3 días hasta conseguir una turbidez correspondiente al 0,5 de McFarland.
- Agitar la suspensión con vórtex durante 15-20 s. Si persisten los grumos, esperar a que desciendan al fondo del tubo y transferir 0,5 ml del sobrenadante a un tubo con 4,5 ml de agua destilada (dilución 1:10 = $1,5 \times 10^7$ UFC/ml).
- Agitar la dilución con vortex durante 15-20 s y añadir 4 ml de la misma a 36 ml de agua destilada (dilución 1:10 = $1,5 \times 10^6$ UFC/ml).

7.1.4. Inoculación e incubación

- Inocular la placa de microdilución mediante una pipeta multicanal. Se transferirán 10 µl (0,01 ml) de la dilución bacteriana final en cada pocillo, que contiene 100 µl (0,1 ml) del caldo de cultivo con la concentración del antimicrobiano correspondiente. Por tanto, se añade una nueva dilución 1:10, consiguiendo una concentración bacteriana de $1,5 \times 10^5$ UFC/ml o $1,5 \times 10^4$ UFC por pocillo.
- El pocillo de control negativo o esterilidad no se inoculará.
- Las placas se deberán sellar mediante un plástico adhesivo e incubar a 30°C en atmósfera aerobia normal entre 3 y 5 días.

7.2. CONTROL DE CALIDAD

- Para descartar una posible *contaminación* bacteriana o fúngica, a parte del pocillo de control, es recomendable transferir del inóculo bacteriano 0,1 ml a una placa de agar sangre e incubar a 35-37°C durante 72 h.
- Es aconsejable utilizar una cepa de control con los lotes nuevos de cada antimicrobiano a estudiar. La cepa de referencia recomendada es *Mycobacterium peregrinum* ATCC 700686 que se incubará a 30°C durante 3 días. Alternativamente se puede utilizar *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Los criterios interpretativos de los resultados obtenidos con las cepas de control aparecen en la tabla 2 (ver Anexo).

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Comprobar diariamente que no existe una contaminación bacteriana o fúngica.
- No se debe prolongar la incubación más allá de 5 días, por la posible alteración (inestabilidad) de los agentes antimicrobianos. En cualquier caso, los resultados tras 5 días de incubación suelen ser poco fiables.
- Los resultados se deberán leer e interpretar tras 3 días de incubación.
- En general, con un crecimiento adecuado, las pruebas de sensibilidad de *M. fortuitum* y *M. peregrinum* se

pueden leer al tercer día de incubación. Si no fuera así se debería incubar 1 ó 2 días más.

- La CIM se define como la concentración más baja de antimicrobiano en la que no hay crecimiento bacteriano visible. En el caso del sulfametoxazol, la CIM sería la correspondiente al pocillo donde se observa una inhibición del crecimiento del 80% (aproximadamente) en comparación con el pocillo de control.
- Los criterios de interpretación (puntos de corte) aparecen en la tabla 1 (ver Anexo).

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

Aunque se trate de micobacterias, en el caso de las especies de crecimiento rápido no son necesarias las medidas de protección de nivel 3, dado que se trata de organismos de nivel 2. Sí que podría ser deseable la preparación de las placas y la inoculación de las mismas en una cabina de flujo laminar con capacidad de proteger la muestra, para evitar en lo posible las contaminaciones fúngicas.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El método de microdilución en caldo queda casi limitado a aquellos laboratorios que, además de la experiencia suficiente, tengan un número elevado de aislamientos de micobacterias de crecimiento rápido. De no ser así, pueden utilizarse técnicas alternativas para un estudio provisional (E-test, difusión con discos) y enviar las bacterias a un centro de referencia para confirmar los resultados.

Aunque existen placas de microdilución comerciales, la mayoría contienen antimicrobianos y concentraciones de los mismos que no se adecuan a las recomendaciones realizadas para estas bacterias y, por tanto, deberán prepararse en el laboratorio.

Para una correcta valoración de los resultados es preciso llegar a una identificación de especie a la que no todos los laboratorios pueden acceder.

La claritromicina y el sulfametoxazol pueden presentar puntos de corte de difícil lectura. La recomendación actual es interpretar únicamente los pocillos con una clara inhibición del crecimiento en el caso de la claritromicina. Sin embargo, para el sulfametoxazol, como se mencionó en el apartado 8, el punto de corte se establece con el 80% de inhibición del crecimiento.

Cuando se observen patrones de resistencia inhabituales (cepas de *M. abscessus* resistentes a la amicacina o *M. fortuitum* resistentes al imipenem, por ejemplo) deberían ser estudiados de nuevo y, eventualmente, enviados a centros de referencia especializados en este tipo de estudios.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Brown-Elliott, B.A., and R.J. Wallace, Jr.. 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:716-746.
2. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory Diagnosis of the Mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Inderlied, C.B., and G.E. Pfyffer. 2003. Susceptibility Test Methods: Mycobacteria, p. 1149-1177. *In*: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
4. Inderlied, C. B., and K. A. Nash. 1996. Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing, spectra of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biologic fluids, p. 127-175. *In* V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. 4th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
5. Master, R.N. 1995. Mycobacteriology p. 3.0.1-3.16.4. *In*: H.D. Isenberg (ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; Approved Standard. Document M24-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

ANEXO

Tabla 1. Criterios de interpretación de las pruebas de sensibilidad de las micobacterias de crecimiento rápido mediante microdilución en caldo.

Antimicrobiano	CIM(µg/ml)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Amicacina	≤ 16	32	≥ 64
Cefoxitina	≤ 16	32-64	≥ 128
Ciprofloxacino	≤ 1	5	≥ 4
Claritromicina	≤ 2	4	≥ 8
Doxiciclina	≤ 1	2-8	≥ 16
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16
Sulfametoxazol	≤ 32	-	≥ 64
Tobramicina	≤ 4	8	≥ 16

Tabla 2. Propuesta de control de calidad de las CIMs en las cepas de referencia para las pruebas de sensibilidad en micobacterias de crecimiento rápido.

Antimicrobiano	<i>M. peregrinum</i> (µg/ml)	<i>S. aureus</i> (µg/ml)
Amicacina	≤ 1 - 4	1 - 4
Cefoxitina	16 - 32	1 - 4
Ciprofloxacino	≤ 0,12 - 0,5	0,12 - 0,5
Claritromicina	≤ 0,06 - 0,5	0,12 - 0,5
Doxiciclina	0,12 - 0,5	0,12 - 0,5
Imipenem	2 - 16	ND ^a
Cotrimoxazol	≤ 1 - 4	32 - 128
Tobramicina	4 - 8	0,12 - 1

^a ND: No disponible.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Epidemiología molecular del complejo <i>M. tuberculosis</i> mediante <i>Spoligotyping</i>	PNT-BK-12	
		Edición N° 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es definir la metodología para la realización de la técnica de detección y tipificación molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis* utilizando la técnica de *Spoligotyping*. Salvo situaciones concretas, no posee un gran valor diagnóstico, por lo que debe plantearse su aplicación en el contexto de estudios epidemiológicos de cribado como una posible alternativa al método de RFLP de la IS6110 cuando se necesitan resultados de forma rápida o cuando las cepas a tipar tengan menos de 5 copias de la IS6110. En la actualidad es el método de tipado molecular más utilizado para las cepas de *M. bovis* ya que únicamente poseen una o dos copias de la IS6110.

2. FUNDAMENTO

La tipificación molecular de *M. tuberculosis* es una herramienta de gran valor epidemiológico que parte de la asunción de que cepas con idéntico patrón molecular están relacionadas. Gracias a ello se puede ponderar la importancia de los casos debidos a infección reciente y los debidos a reactivación de infección pasada. Así mismo, permite el estudio de brotes de casos relacionados, siendo un complemento importante del estudio convencional de contactos. Por otra parte, también es de gran utilidad en el estudio de la virulencia y capacidad de transmisión de las cepas resistentes. Por último, puede utilizarse como herramienta de control de calidad en los laboratorios para la detección y confirmación de contaminaciones cruzadas en el procesamiento de las muestras.

La técnica de *spoligotyping* (*spacer oligotyping*) se basa en la detección de la presencia o ausencia de secuencias espaciadoras conocidas (34 a 41 pb), entre las múltiples copias (10 a 50) de las secuencias cortas DR (Direct Repeat) que están organizadas en un *locus* cromosómico único del complejo *M. tuberculosis*. Una vez extraído el ADN de la bacteria, se realiza una amplificación mediante PCR de estas secuencias obteniendo productos de amplificación (amplicones) de diferentes tamaños. Posteriormente estos amplicones se hibridan sobre una membrana donde se encuentran fijados 43 oligonucleótidos diferentes. Treinta y siete de éstos corresponden a las secuencias espaciadoras de la cepa patrón *M. tuberculosis* H37Rv y 6 corresponden a *M. bovis* (BCG). Los productos de hibridación se detectan mediante quimioluminiscencia.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica (procedimiento 10). Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC 2000.

Procedimientos específicos mencionados en la bibliografía (punto 12).

4. MUESTRAS

Aislamientos de *M. tuberculosis* en cultivo puro correspondientes a las muestras de cada paciente.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Medio de cultivo Löwenstein-Jensen (L-J).
- Tubos de medio de cultivo con agar 7H10 o 7H11 de Middlebrook.
- Agua destilada (libre de nucleasas).
- Tampón TE 10X: 100 mM Tris/HCl pH=8 y 10 mM EDTA). Disolver en agua destilada. Autoclavar a 121°C, 15 min. Conservar a temperatura ambiente hasta 1 año.
- Tampón TE 1X: dilución 1:10 de tampón TE 10X.
- Solución de lisozima: 10 mg de lisozima/1ml. Preparar y guardar en alícuotas de 1ml a -20°C.
- SDS al 10%: disolver 10 g de SDS en 100 ml de agua destilada. Disolver a 65°C. No autoclavar. Conservar a temperatura ambiente hasta 1 mes.
- Proteinasa K: 10 mg de proteinasa K por ml de agua destilada. Conservar en alícuotas a -20°C. Se mantendrá estable hasta 1 año.
- SDS/Proteinasa K. Por muestra: 5 µl de proteinasa K y 70 µl de solución de SDS al 10%. Preparar en el momento la cantidad adecuada para el número de muestras a estudiar.
- NaCl 5M: 29,2 g de NaCl y 100 ml de agua destilada. Disolver, autoclavar y conservar a temperatura ambiente hasta 1 año.
- Solución CTAB/NaCl: disolver 4,1 g de NaCl en 80 ml de agua destilada. Después de disolverse añadir 10 g de CTAB (N-cetyl-NNN-trimethyl ammonium bromide). Calentar a 65°C para disolver. Ajustar el volumen a 100 ml con agua destilada. Conservar a temperatura ambiente hasta 6 meses.
- Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1: mezclar 24 volúmenes de cloroformo con 1 volumen de alcohol isoamílico. Conservar a temperatura ambiente hasta 1 año.
- Etanol al 70%: mezclar 7 volúmenes de etanol con 3 volúmenes de agua destilada. Conservar a temperatura ambiente hasta 1 año.
- Reactivo de lisis:
 - Bolitas de vidrio de 102 µm estériles.
 - Reactivo 1 de sondas MTBC (Gen Probe): 6,3 µl.
 - Reactivo 2 de sondas MTBC (Gen Probe): 6,3 µl.
 - Medio 7H9 de Middlebrook (sin OADC ni antibióticos): 187,5 µl.
- Dinucleótidos trifosfato (dNTP).
- Primers o iniciadores o cebadores:
 - DRa-Biotina (5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC). Conservar a 4°C. NO CONGELAR.
 - DRb (5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC). Conservar congelado a -20°C.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Epidemiología molecular del complejo <i>M. tuberculosis</i> mediante <i>Spoligotyping</i>	PNT-BK-12	
		Edición N° 01	Página 3 de 7

- Tampón de la PCR 10X.
- MgCl₂ (si no estuviera incluido en el tampón de PCR).
- *Taq* Polimerasa.
- Marcadores de pesos moleculares (p. ej. 100 pb ADN *ladder*).
- Agarosa.
- EDTA 0,5M pH=8: 186,2 g de EDTA en un litro de agua destilada. Ajustar el pH.
- Tampón de carga 5X:
 - 50 ml de glicerol 50% (25 ml de glicerol disueltos en 25 ml de agua destilada).
 - 5 mM Tris/HCl pH=7,5 (5 ml de 1M Tris/HCl pH=7,5).
 - 5 mM EDTA (5 ml de 100 mM EDTA).
 - 0,05% azul de bromofenol (50 mg).
 - Completar hasta 100 ml con agua destilada.
- TBE 10X (tampón Tris-Borato-EDTA) pH=8:
 - Trizma base 89 mM (108 g).
 - EDTA 2,5 mM (7,5 g).
 - Ácido bórico 89 mM (55 g).
 - Agua destilada 1 litro.
 - Autoclavar a 121°C durante 15 min. Conservar a temperatura ambiente hasta un año.
- Bromuro de etidio 500 µg/ml: disolver 50 mg de bromuro de etidio en 100 ml de agua destilada. Conservar la solución a 4°C en un recipiente oscuro para protegerla de la luz. Mantener hasta un año.
- NaHCO₃ 500 mM, pH=8,4: disolver 10,5 g de NaHCO₃ en 250 ml de agua destilada.
- EDAC al 16% (w/v): disolver 1,6 g de EDAC en 10 ml de agua destilada.
- NaOH 100 mM: disolver 0,8 g de NaOH en 200 ml de agua destilada.
- SSPE 20X. Es la solución madre para otros reactivos. Disolver en 1.000 ml de agua 35,6 g de Na₂HPO₄*2H₂O (0,2 M), 210,24 g de NaCl (3,6 M), 7,4 g de EDTA (20 mM). Ajustar el pH a 7,4. Autoclavar y conservar a temperatura ambiente hasta 1 año.
- SSPE 2X: diluir 20 veces la solución SSPE 20X con agua destilada.
- SDS al 10%: 10 g de SDS en 100 ml de agua destilada.
- SSPE 2X / SDS al 0,1%: añadir 100 ml de SSPE 20X y 10 ml de SDS 10% a 890 ml de agua destilada.
- SSPE 2X / SDS al 0,5%: añadir 100 ml de SSPE 20X y 50 ml de SDS 10% a 850 ml de agua destilada.
- Oligonucleótidos de las secuencias espaciadoras (n=43). Ver nombre y secuencia detallada en el anexo 1.
- Membrana Biodyne C.
- Líquido de detección ECL.

• Películas radiográficas 18x24 cm.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica IIA o IIB3.
- Frigorífico (2-8 °C).
- Congelador (-20°C).
- Centrífuga con sistema de cierre de seguridad.
- Microcentrífuga para tubos tipo Eppendorf (13.000 rpm).
- Hornillo o agitador magnético con bloque térmico.
- Barras magnéticas.
- Nefelómetro (en su defecto, estándar de densidad n° 1 de McFarland).
- Bloques de calor seco o termobloques regulables.
- Termociclador rápido para tubos de microcentrífuga de 0,2 ml.
- Fuente de alimentación para electroforesis convencional.
- Cubetas de electroforesis
- Agitador vórtex.
- Trans-iluminador de UV.
- Equipo de vacío para aspiración.
- Sistema Miniblotter MN45.
- Hornos de hibridación a 42 y 60°C.
- Cuarto oscuro para revelado fotográfico incorporando cubetas y luz roja.
- *Cassette* para revelado de película radiográfica.
- Equipo de imágenes de geles de electroforesis.
- Sistema de análisis de imágenes.
- Perlas de vidrio estériles.
- Micropipetas de volumen variable (0,5-10 µl; 5-40 µl; 40-200 µl; 200-1000 µl).
- Puntas de micropipetas con filtro estériles.
- Tubos de microcentrífuga tipo Eppendorf.
- Asas de siembra estériles.
- Bandejas porta-tubos de microcentrífuga.
- Cajas de congelación para tubos de microcentrífuga.
- Gradillas congeladora (-20°C) y refrigeradora (2-8°C) de poyata.

7. PROCESAMIENTO

7.1. REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA

7.1.1. Obtención del ADN

7.1.1.1. Método convencional (purificación del ADN cromosómico mediante CTAB)

- Inocular la cepa en medio de Löwenstein-Jensen o en tubos de Middlebrook 7H10 o 7H11 (el crecimiento es más abundante que en L-J) e incubar a 37°C hasta obtener un crecimiento apreciable.
- Transferir un asa de cultivo abundante a un tubo Eppendorf con 400 µl de TE 1X e inactivar durante 20 minutos a 80°C. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

- Añadir 50 µl de lisozima (10 mg/ml) y agitar con vortex durante 1 minuto. Incubar a 37°C una hora, aunque si es posible, mejor durante toda la noche.
- Añadir 75 µl de la solución de SDS/Proteinasa K, agitar 10 segundos e incubar a 65°C durante 10 min.
- Añadir 100 µl de NaCl 5 M y agitar 10 segundos.
- Añadir 100 µl de la solución CTAB/NaCl, que previamente se habrá calentado a 65°C. Agitar en vortex hasta obtener una solución de aspecto lechoso. Este paso es crítico para evitar pérdidas de ADN. A continuación incubar 10 minutos a 65°C.
- Añadir 750 µl de cloroformo/isoamílico, agitar 1 minutos y centrifugar a 12.000 g durante 5 minutos.
- Transferir la fase acuosa (sobrenadante) a un tubo de microcentrifuga limpio.
- Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol (450 µl) y mantener a -20°C durante un mínimo de 30 minutos (mejor toda la noche).
- Centrifugar a 12.000g durante 15 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Añadir 1 ml de etanol al 70% frío (conservado a -20°C) y mezclar.
- Centrifugar a 12.000 g durante 5 minutos y descartar el sobrenadante.
- Secar el sedimento en estufa de 37°C durante 30 minutos o en un *Speed Concentrador* durante 5 minutos.
- Resuspender el sedimento en 100 µl de TE 1X. Mantener a 37°C hasta resuspender completamente.
- Guardar el ADN a 4°C o congelado hasta la siguiente fase.

7.1.1.2. Método alternativo (ADN sin purificar): lisis bacteriana

- Se puede partir de un cultivo sólido o líquido puro y bien crecido de *M. tuberculosis* complex.
- A partir de cultivo sólido transferir 1-2 asas de cultivo abundantes a un tubo de Eppendorf con 250 µl de TE 1X.
- Inactivar a 80°C durante 1 hora.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 2-5 minutos. Retirar el sobrenadante y resuspender el sedimento con 500 µl de NaCl 150 mM. Repetir este paso, dos veces.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento con 25 µl de agua destilada o mejor TE 1X. Conservar el ADN a 4°C o congelado hasta la siguiente fase.

7.1.2. Amplificación de las secuencias espaciadoras

a) Preparación de los tubos de AMPLIMIX (Volumen 25 µl)

- Preparar entre 1 y 10 tubos de microcentrifuga de 1,5 ml estériles para la solución madre (Tris-HCL 20 mM, KCL 50 mM, CL₂Mg 1,5 mM, dNTPs 400 µM):

Amplimix	1 reacción	42 reacciones (tubo 1,5 ml)
H ₂ O destilada estéril	14 µl	588 µl
Tampón de la PCR	5 µl	210 µl
MgCL ₂	6 µl	252 µl
DNTPs	0,4 µl	16,8 µl

- Una vez realizada la mezcla repartir en tubos tipo Eppendorf de 0,2 ml en alícuotas de 25 µl y conservar a -20°C.

b) Preparación del MASTERMIX (Volumen 25 µl)

- Preparar el día a realizar la reacción de PCR. Añadir la Taq en último lugar. Calcular al menos una reacción más de las necesarias debido a las mermas en la manipulación:

Mastermix	1 reacción	10 reacciones
H ₂ O destilada estéril	10 µl	100 µl
DRa (20 pmol)	5 µl	50 µl
DRb (20 pmol)	5 µl	50 µl
Taq Polimerasa	0,1 µl	1 µl

- Añadir 20 µl del Mastermix a cada tubo de Amplimix.
- ##### c) Mezcla, carga del ADN y reacción de Amplificación (Volumen final 50 µl)
- Añadir 5 µl del ADN diluido (1/10 con agua) a amplificar.
 - Amplificar con el siguiente programa: 3 minutos a 96°C; 20-30 ciclos de amplificación (1 minuto a 96°C, 1 minuto a 55°C, 30 segundos a 72°C); 5-10 minutos de extensión a 72°C.
 - Comprobar la amplificación con electroforesis en gel de agarosa al 1%.

7.1.3. Hibridación y detección

7.1.3.1. Preparación de la membrana con los oligonucleótidos espaciadores

- Activar la membrana Biodyne C con 10 ml de la solución recién preparada de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropinol) carbodiimida (EDAC) al 16%. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos en una botella en rotación.
- Lavar la membrana con agua durante 2 minutos y disponerla inmediatamente en un sistema miniblatter limpio.
- Rellenar los pocillos del miniblatter con 150 µl de la solución de oligonucleótidos diluida (0,125 µM) en NaHCO₃ 500 mM (pH=8,4). Intentar no utilizar el primer y el último pocillo cargando en ellos tinta china diluida 1:100 en SSPE 2X, para dejar una marca en los bordes de la membrana.
- Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Retirar la solución de oligonucleótidos mediante aspiración con una bomba de vacío. Realizarlo en el

Servicio de Microbiología Hospital.....	Epidemiología molecular del complejo <i>M. tuberculosis</i> mediante <i>Spoligotyping</i>	PNT-BK-12	
		Edición Nº 01	Página 5 de 7

mismo orden en que la solución fue añadida a los pocillos.

- Sacar la membrana del miniblotteder e inactivarla mediante la incubación con una solución de NaOH 100 mM en una botella en rotación, durante un máximo de 10 minutos (punto clave).
- Lavar la membrana en un contenedor plástico en agitación suave con 250 ml de una solución SSPE 2X suplementado con un 0,1% de SDS, durante 5 minutos a 60°C.
- Lavar posteriormente la membrana en un contenedor plástico en agitación suave con 100 ml de una solución EDTA 20 mM (pH=8) durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Guardar y conservar la membrana envuelta en papel de plástico (para evitar la deshidratación) a 4°C hasta su uso.

7.1.3.2. Hibridación con los productos de PCR

- Preparar los reactivos necesarios (SSPE 20X, SDS 10%, SSPE 2X / SDS 0,1%, SSPE 2X / SDS 0,5%, SSPE 2X) el día anterior a la hibridación. Se pueden conservar hasta una semana, salvo la solución SSPE 20X que tras esterilizarse se puede conservar hasta 1 año.
- Precalentar los tampones en los hornos de hibridación (a 42°C y 60°C) antes de su uso. Las cantidades necesarias para una membrana así como las temperaturas son:
 - SSPE 2X / SDS 0,1%: 250 ml a 60°C.
 - SSPE 2X / SDS 0,5%: 500 ml a 60°C.
 - SSPE 2X / SDS 0,5%: 500 ml a 42°C.
 - SSPE 2X: 500 ml a temperatura ambiente.
- Añadir 20 µl de los productos de PCR en cada tubo de microcentrífuga (n= 45) rotulado y rellenado previamente con 150 µl de SSPE 2X suplementado con un 0,1% de SDS.
- Desnaturalizar el producto de PCR diluido a 99-100°C durante 10 minutos. Enfriar en hielo inmediatamente.
- Lavar la membrana con 250 ml de SSPE 2X suplementado con 0,1% de SDS durante 5 minutos a 60°C.
- Disponer la membrana activada y un soporte acolchado (no reutilizado) en el miniblotteder, de modo que las hendiduras y, por tanto, los bordes marcados con tinta china, queden orientados de manera perpendicular respecto a la línea patrón de los pocillos con los oligonucleótidos.
- Eliminar el líquido residual de los pocillos/hendiduras del miniblotteder mediante aspiración.
- Cargar los pocillos del miniblotteder con 150 µl de los productos de PCR diluidos evitando la formación de burbujas. En el caso de que algún pocillo no tenga muestra se llenará con SSPE 2X suplementado con

un 0,1% de SDS para evitar la contaminación cruzada con los pocillos vecinos.

- Incubar (hibridar) a 60°C durante 1 hora en el horno de hibridación en posición horizontal y sin agitación. *Nota:* Se recomienda sellar los dos extremos del minoblotteder con cinta de autoclavar para prevenir posibles contaminaciones derivadas de la evaporación.
- Eliminar el contenido (muestras) de los pocillos del miniblotteder mediante aspiración y retirar la membrana cuidadosamente con unas pinzas.
- Lavar la membrana 2 veces con 250 ml de SSPE 2X y un 0,5% de SDS durante 10 minutos a 60°C.
- Disponer la membrana en un rulo entre 2 "Nylon Mesh" de una botella en agitación para que se enfríe y evitar así una posible inactivación de la peroxidasa en el siguiente paso.
- Incubar la membrana con una dilución 1:4000 del conjugado estreptavidina-peroxidasa (2,5 µl del conjugado en 10 ml de SSPE 2X con 0,5% de SDS) durante 45-60 minutos a 42°C de un horno de hibridación en una botella con agitación.
- Lavar la membrana 2 veces con 250 ml de SSPE 2X con un 0,5% de SDS durante 10 minutos a 42°C.
- Retirar el exceso del reactivo escurriendo con cuidado la membrana sobre un papel de filtro con el lado del estudio hacia arriba.
- Aclarar la membrana 2 veces con 250 ml de SSPE 2X durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Escurrir de nuevo la membrana hasta que este completamente seca.

7.1.3.3. Detección de la hibridación

Todo el proceso debería realizarse en una habitación con luz roja.

- Mezclar 10 ml del *detection reagent 1* (ECL, Amersham) con 10 ml del *detection reagent 2* (ECL Amersham).
- Colocar la membrana en una bandeja y bañarla con la mezcla durante 1 minuto y en agitación continua, preferiblemente de forma manual.
- Retirar la membrana cuidadosamente y quitar el exceso de solución poniéndola sobre un papel de filtro.
- Envolver la membrana en un plástico transparente e introducirla en el interior de un *cassette* de radiografía. Disponer encima de la membrana una placa de radiografía (película fotográfica) sobre la membrana y cerrar el *cassette*. Mantener la exposición durante 5-30 minutos.
- Revelar la placa y si fuera necesario, disponer una segunda placa en el *cassette* con un tiempo de exposición mayor o menor según el resultado obtenido con la primera.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Epidemiología molecular del complejo <i>M. tuberculosis</i> mediante <i>Spoligotyping</i>	PNT-BK-12	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

7.1.3.4. Regeneración de la membrana

El producto de PCR hibridado puede ser disociado de la membrana (regeneración), pudiendo ser utilizada para una nueva hibridación. Después de cada hibridación y detección la membrana deberá ser regenerada, pudiendo utilizarse hasta 15 veces aproximadamente.

- Lavar la membrana 2 veces con SDS 1% durante 30 minutos (cada vez) y a 80°C en horno de hibridación.
- Eliminar el SDS y lavar con EDTA 20 mM (pH=8) durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación.
- Retirar el EDTA y guardar a 4°C la membrana húmeda envuelta en plástico transparente y cerrado lo más herméticamente posible para evitar la deshidratación.

7.2. CONTROL DE CALIDAD

- Deben establecerse etiquetados y controles de caducidad de los reactivos y soluciones de biología molecular, de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes o de la literatura.
- Como control positivo deben incorporarse en cada membrana dos cepas de referencia: una de *M. tuberculosis* (H37Rv) y otra de *M. bovis* (BCG P3). Ambas han de mostrar el patrón de hibridación característico al revelar el filtro.
- Como control negativo utilizar agua destilada.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Los resultados se visualizan directamente en la película fotográfica después de revelarla. Las hibridaciones de cada cepa deben ser lo suficientemente nítidas como para ser distinguibles y diferenciables entre ellas.
- Dos cepas iguales serán aquellas que compartan el mismo número y posición de hibridaciones.
- Los resultados obtenidos se registraran en los impresos para tal efecto, así como en la base de datos del programa de gestión del laboratorio, si ello fuera requerido. Los resultados deberán ser revisados y validados por el facultativo responsable.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de micobacterias y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.

El procedimiento debería llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el Facultativo Especialista Responsable del Laboratorio de Micobacterias.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología. En el caso de las micobacterias deberán seguirse las normas básicas de protección frente a los agentes biológicos del grupo 3.

En las técnicas de biología molecular y especialmente de amplificación genómica existen diversos aspectos estructurales y de praxis técnica que deberán tener en cuenta.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las limitaciones más importantes de esta técnica se fundamentan en su menor capacidad discriminativa respecto a la RFLP de la IS6110 en las cepas de *M. tuberculosis* con 5 o más copias de la IS6110.

Aunque es un método más rápido y sencillo que la técnica de RFLP, no deja de ser un procedimiento laborioso, que requiere una dedicación e infraestructura importante.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Aranaz, A., E. Liébana, A. Mateos, L. Domínguez, D. Vidal, M. Domingo, O. Gonzalez, E.F. Rodríguez-Ferreri, A.E. Bunschoten, J.D.A. van Embden, and D. Cousins. 1996. Spacer Oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for study epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 34:2734-2740.
2. March, F., P. Coll, R. Costa, P. Rodríguez, C. Moreno, M. Garrigó y G. Prats. 1996. Utilidad de DR, PGRS y *spoligotyping* en la tipificación de *Mycobacterium tuberculosis*. Comparación con IS6110. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 14:160-166.
3. Kanduma, E., T.D. McHugh and S.H. Gillespie. 2003. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *J. Appl. Microbiol.* 94:781-791.
4. Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35:907-914.
5. Kremer, K., A. Bunschoten, L. Schouls, A. Kolk, D. van Soolingen, and J. van Embden. 2002. "Spoligotyping". A PCR-based method to simultaneously detected and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *In: Concerted action on the molecular epidemiology of tuberculosis. Protocol Version 4, RIVM. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.* <https://hypocrates.rivm.nl/bnwww/index.html>.
6. Van Soolingen, D. 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J. Intern. Med.* 249:1-26.

7. Vincent, V., B.A. Brown-Elliott, K.C. Jost Jr., and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: Phenotypic and Genotypic Identification, p. 560-584. In: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.

ANEXO 1. Secuencias espaciadoras.

n° orden	Nombre del oligonucleótido	Concentración (pmol/150 µl)	secuencia
1	SP-F310A	12,5	ATAGAGGGT <u>CGCCGGT</u> TCTGGATCA ¹
2	SP-F320A	30	CCTCATAATTGGGCGACAGCTTTTG ²
3	SP-F330A	12,5	CCGTGCTTCCAGTGATCGCCTTCTA
4	SP-F340A	12,5	ACGTATACGCCGACCAATCATCAG
5	SP-F350A	12,5	TTTTCTGACCATTGTGCGGGATTA
6	SP-F360A	12,5	CGTCGTCATTTCCGGCTTCAATTC
7	SP-F370A	25	GAGGAGAGCGAGTACTCGGGGCTGC
8	SP-F380A	50	CGTCAAACCGCCCCAGCCTCGCCG
9	SP-F390A	12,5	ACTCGGAATCCCATGTGCTGACAGC
10	SP-F400A	15	TCGACACCCGCTCTAGTTGACTTCC
11	SP-F410A	30	GTGAGCAACGGCGGCGGCAACCTGG
12	SP-F420A	60	ATATCTGCTGCCCGCCGGGAGAT
13	SP-F430A	12,5	GACCATCATTGCCATTCCCTCTCC
14	SP-F440A	30	GGTGTGATCGGGATGGTCCGGCTCGG
15	SP-F450A	30	CTTGAATAACGCGCAGTGAATTCG
16	SP-F455A	12,5	CGAGTTCCCCTCAGCGTCGTAAATC
17	SP-F457A	100	GCGCCGGCCCGCGCGGATGACTCCG
18	SP-F460A	12,5	CATGGACCCGGCGAGCTGCAGATG
19	SP-F470A	12,5	TAACTGGCTTGGCGCTGATCCTGGT
20	SP-F480A	12,5	TTGACCTCGCCAGGAGAGAAGATCA
21	SP-F490A	25	TCGATGTCGATGTCCCAATCGTCGA
22	SP-F500A	12,5	ACCGCAGACGGCACGATTGAGACAA
23	SP-F510A	50	AGCATCGCTGATGCGGTCCAGCTCG
24	SP-F520A	50	CCGCCTGCTGGGTGAGACGTGCTCG
25	SP-F530A	25	GATCAGCGACCACCGCACCCGTGTC
26	SP-F540A	12,5	CTTCAGCACCATCATCCGGCGC
27	SP-F550A	25	GGATTCGTGATCTCTTCCCGCGGAT
28	SP-F560A	12,5	TGCCCCGGCGTTTAGCGATCACAAC
29	SP-F570A	12,5	AAATACAGGCTCCACGACACGACCA
30	SP-F580A	12,5	GGTTGCCCGCGCCCTTTTCCAGCC
31	SP-F590A	12,5	TCAGACAGGTTCCGCGTCGATCAAGT
32	SP-F600A	25	GACCAAATAGGTATCGGCGTGTTC
33	SP-F610A	100	GACATGACGGCGGTGCCGCACTTGA
34	SP-F620A	25	AAGTCACCTCGCCACACCGTCGAA
35	SP-F630A	12,5	TCCGTACGCTCGAAACGTTCCAAC
36	SP-F640A	12,5	CGAAATCCAGCACCATCCGCAGC
37	SP-F650A	12,5	CGCGAACTCGTCCACAGTCCCCCTT
38	SP-F660A	25	CGTGGATGGCGGATGCGTTGTGCGC
39	SP-F670A	25	GACGATGGCCAGTAAATCGGCGTGG
40	SP-F680A	12,5	CGCCATCTGTGCCTCATACAGGTCC
41	SP-F690A	12,5	GGAGCTTCCGGCTTCTATCAGGTA
42	SP-F700A	25	ATGGTGGGACATGGACGAGCGCGAC
43	SP-F710A	50	CGCAGAATCGCACCGGGTGCGGGAG

¹ En la cepa H37Rv la secuencia actual en el nucleótido subrayado es C.

² En la cepa H37Rv la secuencia actual en los nucleótidos subrayados es GC.