

R-13210

T 991



Universidad de Sevilla  
Departamento de Microbiología

**EVALUACIÓN DEL NUEVO SISTEMA Mgit™**  
**PARA EL AISLAMIENTO DE *Mycobacterium tuberculosis***  
**EN MUESTRAS CLÍNICAS Y DETERMINACIÓN**  
**DE LA SENSIBILIDAD A LOS TUBERCULOSTÁTICOS**

**Tesis para optar al Grado de Doctor en Farmacia**  
**que presenta:**

**Pablo Zapata Monge**  
**Dpto de Microbiología. Facultad de Medicina**  
**Universidad de Sevilla**

1998

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Pablo Zapata Monge', written over a horizontal line.

**DIRECTOR:**

**Dr. Javier Aznar Martín**



Universidad de Sevilla  
Departamento de Microbiología  
Prof. Javier Aznar Martín

**D. Javier Aznar Martín, Profesor Titular de Microbiología de la  
Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,**

**C E R T I F I C A :**

Que la tesis para optar al Grado de Doctor en Farmacia que lleva por título "Evaluación del nuevo sistema Mgit<sup>tm</sup> para el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas y determinación de la sensibilidad a los tuberculostáticos", ha sido realizada por D. Pablo Zapata Monge, bajo mi supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste donde proceda firmo el presente certificado en Sevilla a quince de Julio de mil novecientos noventa y ocho.

Edo. Prof. Dr. Javier Aznar Martín

**EVALUACIÓN DEL NUEVO SISTEMA Mgit™**  
**PARA EL AISLAMIENTO DE *Mycobacterium tuberculosis***  
**EN MUESTRAS CLÍNICAS Y DETERMINACIÓN**  
**DE LA SENSIBILIDAD A LOS TUBERCULOSTÁTICOS**

**Tesis para optar al Grado de Doctor en Farmacia  
que presenta:**

**Pablo Zapata Monge**  
**Dpto. de Microbiología. Facultad de Medicina**  
**Universidad de Sevilla**  
**1998**

**DIRECTOR:**  
**Dr. Javier Aznar Martín**

**A mi sobrino Jorge**

**A mi mujer Natividad**

**A mi hijo**



## ***AGRADECIMIENTOS***

Durante prácticamente casi cinco años he tenido la oportunidad de adquirir y ampliar mis conocimientos profesionales en Microbiología en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla. De éstos cinco años he dedicado parte de mi tiempo, trabajo e ilusión a una labor de estudio e investigación que no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de un grupo humano.

En primer lugar, quisiera dar mi más sincero agradecimiento al Prof. Javier Aznar Martín, quien supo siempre guiarme en los muchos momentos de confusión de esta Tesis Doctoral. Gracias de todo corazón, con admiración y respeto, por su trabajo, profesionalidad y generosidad.

A Sofía Ballesta y a Francisco Fernández Lineros, por su inestimable ayuda en la realización de los cálculos estadísticos de ésta Tesis Doctoral.

A todo el Departamento de Microbiología. Mi gratitud por haber compartido conmigo vuestros conocimientos, por vuestra paciencia y por vuestra amistad.

A Eulalia Poó y a mi hermana Yolanda por su colaboración en la parte final de mi trabajo.

A mis compañeros y amigos de Becton-Dickinson, en especial a Luis de la Fuente, José Manuel Verdejo y José Manuel Torres por su apoyo y aportación técnica para la realización de este trabajo.

A mi mujer, Natividad, por su apoyo y por su infinita paciencia.

**EVALUACIÓN DEL NUEVO SISTEMA Mgit™ PARA EL AISLAMIENTO DE  
*Mycobacterium tuberculosis* EN MUESTRAS CLÍNICAS Y DETERMINACIÓN DE LA  
SENSIBILIDAD A LOS TUBERCULOSTÁTICOS**

---

---

***INDICE***

# ÍNDICE GENERAL

## 1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Evolución Histórica de la Tuberculosis . . . . .	1
1.2.- Diagnóstico Microbiológico . . . . .	7
1.2.1.- Nuevos métodos de cultivo de <i>M.tuberculosis</i> . . . . .	12
1.2.2.- Métodos moleculares. . . . .	18
1.2.2.1.-Métodos de identificación epidemiológica . . . . .	19
1.2.2.2-Detección de resistencias . . . . .	20

## 2.- JUSTIFICACIÓN DE ESTUDIO Y OBJETIVOS

2.1.- Justificación del Estudio . . . . .	22
2.2.- Objetivos . . . . .	24

## 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Diagnóstico microbiológico de las infecciones por <i>M.tuberculosis</i> : Baciloscopia y Cultivo . . . . .	26
3.1.1.- Cepas control y Muestras clínicas . . . . .	26
3.1.2.- Soluciones y tinciones . . . . .	27
3.1.3.- Medios de cultivo y suplementos . . . . .	28
3.1.4.- Baciloscopia . . . . .	30
3.1.5.- Cultivo: Siembra e Inoculación . . . . .	32
3.1.6.- Análisis estadístico . . . . .	36
3.1.7.- Identificación mediante hibridación por sondas específicas . . . . .	36
3.2.- Determinación de la sensibilidad a los tuberculostáticos . . . . .	37
3.2.1.- Cepas utilizadas en el estudio . . . . .	37
3.2.2.- Medios de cultivo . . . . .	38
3.2.3.- Determinación de la sensibilidad mediante sistema radiométrico . . . . .	40
3.2.4.- Determinación de la sensibilidad mediante sistema Mgit™. . . . .	41
3.2.5.- Determinación de la sensibilidad en medio sólido . . . . .	46

3.2.6.- Estudio estadístico y comparación de los tres métodos de antibiograma .....	47
3.3.- Detección de las cepas resistentes a rifampicina mediante amplificación-hibridación .....	48
3.3.1.- Detección de mutaciones en el gen <i>rpoB</i> mediante sistema Inno-Lipa Rif TB .....	49
4.- <b>RESULTADOS</b>	
4.1.- Evaluación preliminar del sistema Mgit™ .....	51
4.2.- Evaluación del sistema Mgit™ para aislamiento de <i>M.tuberculosis</i> en muestras clínicas .....	55
4.2.1.- Evaluación de la sensibilidad de los sistemas .....	55
4.2.2.- Evaluación de los tiempos de detección .....	60
4.3.- Evaluación del sistema Mgit™ para la determinación de la sensibilidad a los tuberculostáticos .....	70
4.3.1.- Determinación de la sensibilidad en el sistema Mgit™ .	70
4.3.2.- Evaluación de los tiempos de detección .....	91
4.3.3.- Determinación de la sensibilidad a los tuberculostáticos mediante el método de las proporciones en Löwenstein-Jensen .....	95
4.3.4.- Determinación de la sensibilidad a la Rifampicina mediante métodos moleculares .....	101
5.- <b>DISCUSIÓN</b>	
5.1.- Mgit™:Nuevo sistema para cultivo de Micobacterias .	106
5.2.- Estudio de la sensibilidad a los tuberculostáticos .....	115
6.- <b>CONCLUSIONES</b> .....	133
7.- <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	136

## INDICE DE TABLAS

Tabla 4.1	Media en días de crecimiento de las cepas control. ....	53
Tabla 4.2	Distribución de las Muestras Clínicas en Función de su Procedencia .....	56
Tabla 4.3	Comparación de los tres sistemas de cultivo evaluados sobre un total de 310 muestras clínicas. ....	58
Tabla 4.4	Estudio comparativo de la rentabilidad diagnóstica de los tres sistemas de cultivo sobre el total de 48 muestras positivas .	61
Tabla 4.5	Tiempo medio de detección de crecimiento de <i>M.tuberculosis</i> en los diferentes Sistemas de cultivo utilizados. ....	64
Tabla 4.6	Tiempos Medios de Detección en las muestras Baciloscopias Positivas por Sistemas .....	66
Tabla 4.7	Tiempos Medios de Detección en las muestras Baciloscopias Negativas por Sistemas. ....	68
Tabla 4.8	Tiempo Medio de Crecimiento de las Cepas Control en el Sistema Mgit™ .....	72
Tabla 4.9	Resultados de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de <i>M.tuberculosis</i> en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bacter®460TB. Primera Determinación .....	74
Tabla 4.10	Comparación de los resultados obtenidos de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de <i>M.tuberculosis</i> en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bacter®460TB. Primera Determinación .....	76

<b>Tabla 4.11</b>	<b>Evaluación global del sistema Mgit™ en la determinación de la Sensibilidad a los tuberculostáticos de las 52 Cepas.</b>	
	<b>1ª Dterminación .....</b>	<b>78</b>
<b>Tabla 4.12</b>	<b>Resultados de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de <i>M.tuberculosis</i> en los dos Sistemas de Evaluación Mgit™ y Bactec®460TB. 2ªDeterminación .....</b>	<b>81</b>
<b>Tabla 4.13</b>	<b>Comparación de los resultados obtenidos de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de <i>M. tuberculosis</i> en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bactec®460TB. Segunda Determinación .....</b>	<b>83</b>
<b>Tabla 4.14.</b>	<b>Evaluación global del sistema Mgit™ en la determinación de la Sensibilidad, a los tuberculostáticos de las 52 Cepas. Segunda Determinación .....</b>	<b>85</b>
<b>Tabla 4.15</b>	<b>Resultados de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de <i>M.tuberculosis</i> en los dos Sistemas de Evaluación Mgit™ y Bactec®460TB utilizando las mismas concentraciones de SM y RIF. Tercera Determinación .....</b>	<b>87</b>
<b>Tabla 4.16</b>	<b>Comparación de los resultados obtenidos de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bactec®460TB utilizando las mismas concentraciones de SM y RIF. Tercera Determinación .....</b>	<b>89</b>
<b>Tabla 4.17</b>	<b>Evaluación global del Sistema Mgit™ en la determinación de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de las 52 Cepas. Tercera Determinación .....</b>	<b>92</b>
<b>Tabla 4.18</b>	<b>Tiempo Medio de Crecimiento en sistema Mgit™ de las Cepas Sensibles y Resistentes y de sus tubos control (CC) .....</b>	<b>94</b>

<b>Tabla 4.19</b>	<b>Análisis Estadístico Global de los tiempos Medios de Detección de las 52 Cepas de <i>M.tuberculosis</i> con cada Tuberculostático en los dos sistemas evaluados. ....</b>	<b>96</b>
<b>Tabla 4.20</b>	<b>Análisis estadístico de los Tiempos Medios de Crecimiento en la determinación desensibilidad a Estreptomicina (SM) .....</b>	<b>97</b>
<b>Tabla 4.21</b>	<b>Análisis estadístico de los Tiempos Medios de Crecimiento en la determinación de sensibilidad a Isoniacida (INH) .....</b>	<b>98</b>
<b>Tabla 4.22.</b>	<b>Análisis estadístico de los Tiempos Medios de Crecimiento en la determinación de sensibilidad la Rifampicina (RIF) .....</b>	<b>99</b>
<b>Tabla 4.23</b>	<b>Análisis estadístico de los Tiempos Medios de Crecimiento en la determinación de sensibilidad a Etambutol (ET) .....</b>	<b>100</b>
<b>Tabla 4.24</b>	<b>Análisis de los resultados obtenidos por el Método de las Proporciones a RIF y INH en las cepas con resultados discrepantes .....</b>	<b>103</b>
<b>Tabla 4.25</b>	<b>Análisis de los resultados obtenidos en RIF por Métodos Moleculares en las cepas con resultados discrepantes .....</b>	<b>104</b>
<b>Tabla 4.26.</b>	<b>Análisis de los resultados obtenidos en RIF por los cuatro métodos todos evaluados en las cepas con resultados discrepantes .....</b>	<b>105</b>
<b>Tabla 5.1.</b>	<b>Tasas de contaminación en los diferentes sistemas de aislamiento de <i>M.tuberculosis</i> a partir de muestras clínicas .....</b>	<b>109</b>
<b>Tabla 5.2.</b>	<b>Sensibilidad de los sistemas Mgit™, Bactec®460TB, y Löwenstein-Jensen para el aislamiento de <i>M.tuberculosis</i> en muestras clínicas .....</b>	<b>111</b>



<b>Tabla 5.3.</b>	<b>Estudio comparativo de los tiempos medios de crecimiento</b>	<b>114</b>
<b>Tabla 5.4.</b>	<b>Clasificación de los distintos métodos para el cálculo de la susceptibilidad a los tuberculostáticos .....</b>	<b>117</b>
<b>Tabla 5.5.</b>	<b>Concentraciones (<math>\mu</math>/ml) utilizadas en el método de las Concentraciones Absolutas .....</b>	<b>121</b>
<b>Tabla 5.6.</b>	<b>Concentraciones (<math>\mu</math>/ml) utilizadas en el método de la Tasa de Resistencia .....</b>	<b>122</b>
<b>Tabla 5.7.</b>	<b>Concentraciones finales (<math>\mu</math>/ml) utilizadas en el método de elución .....</b>	<b>123</b>
<b>Tabla 5.8.</b>	<b>Concentraciones (<math>\mu</math>/ml) utilizadas en el método de las Proporciones en 7H10 Agar, 7H11 Agar y en el Sistema radiométrico .....</b>	<b>124</b>
<b>Tabla 5.9.</b>	<b>Comparación de los distintos resultados publicados sobre sensibilidad a los tuberculostáticos de <i>M.tuberculosis</i> en el sistema Mgit™ .....</b>	<b>126</b>
<b>Tabla 5.10.</b>	<b>Sensibilidad, Especificidad, Fiabilidad, Valor predictivo positivo (VPP) y Valor predictivo negativo (VPN) de algunos estudios .....</b>	<b>130</b>
<b>Tabla 5.11.</b>	<b>Sensibilidad, Especificidad, Fiabilidad, Valor predictivo positivo (VPP) y Valor predictivo negativo (VPN) de algunos estudios .....</b>	<b>131</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 4.1	Media en días de crecimiento de las cepas control. ....	54
Figura 4.2	Distribución de las Muestras Clínicas en Función de su Procedencia .....	57
Figura 4.3	Comparación de los tres sistemas de cultivo evaluados sobre un total de 310 muestras clínicas. ....	59
Figura 4.4	Estudio comparativo de la rentabilidad diagnóstica de los tres sistemas de cultivo sobre el total de 48 muestras positivas .	62
Figura 4.5	Tiempo medio de detección de crecimiento de <i>M.tuberculosis</i> en los diferentes Sistemas de cultivo utilizados. ....	65
Figura 4.6	Tiempos Medios de Detección en las muestras Baciloscopias Positivas por Sistemas .....	67
Figura 4.7	Tiempos Medios de Detección en las muestras Baciloscopias Negativas por Sistemas. ....	69
Figura 4.8	Tiempo Medio de Crecimiento de las Cepas Control en el Sistema Mgit™ .....	73
Figura 4.9	Resultados de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de <i>M.tuberculosis</i> en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bacter®460TB. Primera Determinación .....	75
Figura 4.10	Comparación de los resultados obtenidos de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de <i>M.tuberculosis</i> en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bacter®460TB. Primera Determinación .....	77

<b>Figura 4.11</b>	<b>Evaluación global del sistema Mgit™ en la determinación de la Sensibilidad a los tuberculostáticos de las 52 Cepas.</b>	
	<b>1ª Dterminación .....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 4.12</b>	<b>Resultados de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de <i>M.tuberculosis</i> en los dos Sistemas de Evaluación Mgit™ y Bactec®460TB. 2ªDeterminación .....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 4.13</b>	<b>Comparación de los resultados obtenidos de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de <i>M. tuberculosis</i> en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bactec®460TB. Segunda Determinación .....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 4.14.</b>	<b>Evaluación global del sistema Mgit™ en la determinación de la Sensibilidad, a los tuberculostáticos de las 52 Cepas. Segunda Determinación .....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 4.15</b>	<b>Resultados de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de <i>M.tuberculosis</i> en los dos Sistemas de Evaluación Mgit™ y Bactec®460TB utilizando las mismas concentraciones de SM y RIF. Tercera Determinación .....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 4.16</b>	<b>Comparación de los resultados obtenidos de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bactec®460TB utilizando las mismas concentraciones de SM y RIF. Tercera Determinación .....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 4.17</b>	<b>Evaluación global del Sistema Mgit™ en la determinación de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de las 52 Cepas. Tercera Determinación .....</b>	<b>93</b>

**EVALUACIÓN DEL NUEVO SISTEMA Mgit™ PARA EL AISLAMIENTO DE  
*Mycobacterium tuberculosis* EN MUESTRAS CLÍNICAS Y DETERMINACIÓN DE LA  
SENSIBILIDAD A LOS TUBERCULOSTÁTICOS**

---

---

***1.- INTRODUCCIÓN***

## 1.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LA TUBERCULOSIS:

En el período Paleolítico, el nomadismo era la forma de vida habitual y no existían asentamientos estables en poblados o en lugares permanentes. Además no se producían grandes aglomeraciones humanas por lo que la tuberculosis al igual que otras enfermedades infecciosas se presentaban de forma esporádica, y no de forma epidémica. En los principios del 8000 antes de Cristo, los humanos desarrollaron unas primitivas técnicas de agricultura que les permitió asentarse en lugares fijos, y con este desarrollo llegó la domesticación del ganado, cerdos, y ovejas. Con toda probabilidad, la tuberculosis ocurrió más frecuentemente en estos asentamientos<sup>1</sup>. McGrath estima que es necesaria una red social que oscile entre 180 a 440 personas para conseguir que la relación entre hospedadores patógenos y la infección por tuberculosis llegue a ser endémica en una comunidad<sup>2</sup>.

La tuberculosis probablemente ocurrió como una enfermedad endémica entre animales mucho antes de que afectara a los humanos<sup>3</sup>. *Mycobacterium bovis* fue el organismo infectante más frecuente, y el primer humano infectado podría haberlo sido por *M.bovis*. *M.tuberculosis* infecta a todas las especies de primates, y es posible también que estas especies bacterianas existieran en primates antes de establecerse en los humanos. Con el paso de siglos y milenios, el ser humano comenzó a vivir en comunidades cada vez más grandes, y con este cambio llegaron cambios ambientales que estuvieron asociados con un cambio en el delicado balance entre humanos y bacilo tuberculoso. Varias teorías alternativas han sido propuestas para explicar la extensión de la epidemia y el posterior declive que siguió de la tuberculosis. De ellas la más ampliamente aceptada implica la evolución genética enérgica en la inmunidad del rebaño<sup>4</sup>. Por regla general, los parásitos tienen una vida más corta comparada con sus huéspedes, y éste hecho concede a los parásitos una gran ventaja, ya que las mutaciones pueden ocurrirles con más frecuencia que a sus huéspedes en respuesta a las presiones del entorno. Cuando el tiempo generacional del huésped es mucho más largo que el del parásito, como así ocurre entre el hombre y el bacilo tuberculoso, el huésped no se puede adaptar tan

rápidamente como el parásito. Así el parásito tiene una ventaja inicial que le permite eliminar los miembros susceptibles de la especie del hospedador antes de que esos individuos puedan transmitirles esos genes de resistencia a la progenie. Sin embargo, mientras no estén eliminados todos huéspedes de una especie, la progenie de supervivientes con genes de resistencia forman un grupo de población que se caracteriza por incrementar la resistencia a ése parásito en particular<sup>5</sup>. Así que, a lo largo del tiempo la ventajosa posición disfrutada por el parásito en principio disminuye, y después de sucesivas generaciones, la que era una infección mortal y seria, pasa a ser menos devastadora. Probablemente por esta razón, las enfermedades no infecciosas han aniquilado en ocasiones completamente la población de su huésped. Muchos otros factores, tales como nutrición y exceso de población, contribuyen sobre la incidencia de la enfermedad en una población, pero los factores genéticos son de incuestionable importancia en la mortalidad selectiva de la infección.

La tuberculosis probablemente ocurrió como una enfermedad esporádica y sin importancia para los humanos en el comienzo de su historia. La propagación de la epidemia comenzó lentamente con el incremento de la densidad de población. Esta propagación unida a la presión selectiva ejercida, ha ocurrido en diferentes momentos alrededor del mundo. La epidemia se extendió lentamente por todo el mundo como consecuencia de los viajes de los europeos infectados hacia lugares lejanos que colonizaron<sup>6</sup>. En el siglo XVIII y principios del XIX, la prevalencia de la tuberculosis llegó a su apogeo en Europa Occidental y EEUU y fué indudablemente la mayor causa de muerte<sup>7</sup>. De cien a doscientos años más tarde, se ha extendido con toda su fuerza hacia el Este de Europa, Asia, África y Sudamérica.

En una población concreta y de un área en particular, la epidemia de la tuberculosis alcanzará su cima dentro de 50-70 años después de haber comenzado, para entonces decrecer lentamente, posiblemente como consecuencia de la reproducción de los huéspedes supervivientes más resistentes.

A la vista de los excelentes resultados terapéuticos obtenidos tras la introducción de los tuberculostáticos se llegó a pensar que la tuberculosis había dejado de ser un importante problema de salud para la humanidad. Sin embargo en 1985 en Estados Unidos se observó que el declive anual de la tuberculosis había sido tan solo del 0,2%, cuando las previsiones epidemiológicas lo situaban entre el 5% y el 7%, atribuyéndose este fenómeno a la elevada incidencia de tuberculosis en enfermos con SIDA. Actualmente, según datos de la OMS, la tuberculosis se está incrementando a nivel mundial tanto en los países desarrollados como en los en vías de desarrollo<sup>8</sup>. Debido a que la tasa de disminución de los casos nuevos de tuberculosis es más baja, especialmente en África y Asia (donde vive el 75% de la población mundial), y a que la tasa de aumento de la población es mayor. Hoy en día existen en el mundo más tuberculosos que en el año 1882 cuando Koch descubrió a *M. tuberculosis*<sup>9</sup>. Se estima que 1,700 millones de personas, es decir, una tercera parte de la población mundial, está infectada por tuberculosis. En el mundo más de 2,9 millones de personas mueren cada año a causa de esta enfermedad, y se estima una incidencia de 8 millones de casos nuevos<sup>9,10</sup>. La proporción global de personas infectadas es similar en los países industrializados y en las naciones subdesarrolladas. Sin embargo el 80% de los individuos afectados en los países industrializados tienen una edad de 50 años ó más, mientras que el 75% de los afectados en países subdesarrollados tienen menos de 50 años de edad<sup>10</sup>.

Actualmente el mayor número de casos se localizan en Asia, África, y Sudamérica, situación ésta que a su vez se ve agravada por la presencia de SIDA endémico en alguno de estos continentes<sup>9,11</sup>. La incidencia más alta de tuberculosis se presenta en el continente africano<sup>10</sup>.

La tuberculosis es una enfermedad bacteriana causada por organismos del complejo *M.tuberculosis* (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, y *M.africanum*). Se transmite principalmente por gotitas transportadas producidas cuando individuos con tuberculosis laríngea o pulmonar estornudan, tocan o hablan. Estos individuos son particularmente infecciosos si excretan suficientes bacilos como para poder visualizarse en una baciloscopia ( $10^5$

bact/ml)<sup>12</sup>. La infección ocurre cuando individuos susceptibles inhalan esas gotitas infectantes. La tuberculosis puede ocurrir en cualquier órgano del cuerpo<sup>12</sup>, aunque sólo del 5 al 15% de los individuos infectados pueden desarrollar la enfermedad activamente después de dos años de la primera infección.<sup>12,13</sup> Los grupos de población en los EEUU que han incrementado el riesgo de infección por *M. tuberculosis* incluyen la población con bajos ingresos económicos, inmigrantes procedentes de países con alta prevalencia de tuberculosis, reclusos con tratamientos a largo plazo y que gozan de permisos penitenciarios. Aquellos que han incrementado el riesgo de desarrollar la enfermedad incluyen a individuos con VIH; los que tienen un estrecho contacto con casos infectantes; niños menores de 5 años; pacientes con insuficiencia renal, silicosis, y diabetes mellitus; e individuos recibiendo tratamiento con medicamentos inmunosupresores.

Existen varios factores que han contribuido al incremento en la incidencia de la tuberculosis como son el deterioro de las infraestructuras de la salud pública, aumento del índice de indigentes y de usuarios de drogas por vía parenteral así como el continuo flujo de inmigrantes a ciudades donde la tuberculosis es endémica<sup>14,17</sup>. La infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el factor de riesgo más importante en el incremento de la tuberculosis<sup>15,21</sup>. La OMS estima que 3,9 millones de personas están coinfectadas con VIH y *M. tuberculosis*<sup>19,22</sup>, y tres cuartas partes de éstas viven en África<sup>21</sup>; la tuberculosis es la complicación más común del VIH en África<sup>23</sup>.

La asociación entre tuberculosis y VIH representa una amenaza inmediata y grave para la salud pública y para la situación socioeconómica, especialmente en los países en desarrollo. El riesgo de desarrollar la tuberculosis activa entre los individuos infectados por VIH es mucho mayor (170 veces más) que el de las personas seronegativas y se estima que el riesgo anual de desarrollar tuberculosis en las personas coinfectadas es del 5 al 8%.<sup>11,22</sup>

En España tras el descubrimiento de la quimioterapia en la década de los 50, la caída de la endemia tuberculosa experimentó un descenso acelerado, lo cual despertó un



optimismo desmesurado llegando a creer que la erradicación de la enfermedad era cuestión de pocos años. El indicador epidemiológico más utilizado en la primera mitad de siglo, la tasa de mortalidad, inició un serio declive antes de la guerra civil, y posteriormente con la introducción de los fármacos antituberculosos. De los 26.206 fallecidos en 1951 se pasó a 9.704 en 1956, aunque en 1962 esta tendencia se había estancado y la mortalidad era una de las más altas del mundo occidental. La excesiva confianza en la medicación en detrimento de otras medidas ha dado lugar a consecuencias que hoy arrastramos, cómo la existencia de un gran número de adultos mal curados y poco vigilados que actúan como contagiantes y diseminadores de la enfermedad, contribuyendo al mantenimiento del estado de endemia tuberculosa<sup>24, 25</sup>. La suma de errores acumulados durante años ha propiciado que aún permanezca infectada un tercio de la población española, con una tendencia a la disminución del riesgo anual de infección (RAI) de sólo un 8% anual, mientras que en los países que tienen un buen control éste descenso es superior<sup>12, 26</sup>.

La mortalidad por tuberculosis sitúa a España entre los países peor situados de la Comunidad Económica Europea y del mundo occidental, por cuanto la tasa es de alrededor del 3 por 100.000 habitantes, muy superior a la de estos países (menos de 2 por 100.000 habitantes), y sin tendencia a la baja<sup>27</sup>. Además, en diversos sectores médicos se tiende a considerar que existe un incremento actual de la tuberculosis en nuestro país. Este hecho se explica por el incremento de las estadísticas oficiales que simplemente es consecuencia de una mejor, aunque aún muy insuficiente, declaración de la enfermedad (en España sólo es obligatorio notificar la tuberculosis de localización respiratoria y no de forma nominal). También han contribuido la crisis económica con intenso paro, la irrupción de los tuberculosos en los hospitales generales al suprimirse sanatorios y servicios especializados, y la influencia del VIH junto al aumento usuarios de drogas por vía parenteral<sup>26 27</sup>.

En los países industrializados el 80% de los infectados con tuberculosis tiene más de 50 años. La coinfección VIH-tuberculosis es poco frecuente porque la infección VIH

se concentra entre los 15 y 49 años de edad. Sin embargo, España presenta una elevada prevalencia tuberculosis en adultos jóvenes, situación que se asocia con tener desde 1991 la tasa más elevada de SIDA de Europa. Estos dos hechos determinan que España posea la máxima posibilidad de desarrollar la coinfección de los países desarrollados <sup>12,28</sup>.

Otro aspecto de máximo interés es el referente al incremento de multiresistencias a fármacos. Desde 1970 se han publicado en EE.UU. brotes de cepas multiresistentes en familias, escuelas, comunidades y refugios para indigentes sin hogar en forma de microepidemias esporádicas, aisladas y con lenta propagación<sup>29</sup>. Desde 1990, han sido reportados por el CDC brotes nosocomiales de tuberculosis multirresistentes (MDR-TB) englobando unos 200 pacientes. Estos brotes han incluido la transmisión de *M.tuberculosis* a pacientes, trabajadores con problemas de salud, presos y empleados con permisos especiales. La investigación de cuatro de estos brotes que ocurrieron en hospitales de Florida y Nueva York demostraron que la mayoría de los casos de MDR-TB ocurrieron en individuos que eran conscientes de estar infectados con VIH<sup>38-46</sup>. El rango de casos fatales entre pacientes con MDR-TB activo fue excepcionalmente alto, 72 a 89%, y el intervalo medio entre el diagnóstico y la muerte era muy corto, de 4 a 16 semanas.

Todos estos brotes han sido caracterizados por la transmisión de cepas e *M.tuberculosis* resistentes al menos a isoniacida (INH) y rifampicina (RIF) (MDR), junto con alguna cepa mostrando resistencia adicional a otros fármacos incluyendo etambutol, estreptomycin, etionamida, kanamicina, y rifabutina. Los retrasos en el diagnóstico de laboratorio y en el informe de resistencias a fármacos antituberculosos contribuye a magnificar los brotes, ya que no fueron rápidamente identificados, bien porque el microorganismo no fue aislado, o que los pacientes no fueron correctamente tratados.

En 1991 Frieden y cols.<sup>31</sup> en un estudio de cada paciente con cultivo positivo de Nueva York, reveló que el 19% presentaba resistencia a INH y RIF conjuntamente. Según datos microbiológicos del grupo de trabajo "Tuberculosis e Infecciones Respiratorias"

(T.I.R.), hasta el año 1992 no se había detectado en España un fenómeno similar<sup>32</sup>. Posteriormente en 1994 fue comunicado un brote de 20 casos de tuberculosis multiresistentes en un hospital de Madrid<sup>32,33</sup>. En España, las resistencias primarias a isoniacida en población general son inferiores al 5% y a la rifampicina inferiores al 2%<sup>32</sup>. En los pacientes VIH positivos no hay diferencias en la tasa de resistencia en el caso de la isoniacida, pero en la de rifampicina, en Madrid, parecen haberse incrementado significativamente<sup>32,34</sup>.

De nuevo la victoria final frente a la tuberculosis parece alejarse una vez más. Es necesario un alto grado de cooperación entre la investigación microbiológica, clínica y epidemiológica, siendo necesario una actuación conjunta en los tres puntos básicos de la lucha antituberculosa:

- 1) el diagnóstico precoz de la enfermedad.
- 2) la búsqueda activa de casos en los colectivos de riesgo.
- 3) el tratamiento controlado y la curación de todos los enfermos<sup>30</sup>.

## 1.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO.

La tuberculosis continúa siendo uno de los principales problemas de salud de la humanidad. A partir de la segunda mitad de la década de los ochenta la tendencia progresivamente decreciente de esta enfermedad se quiebra produciéndose un incremento de los casos de tuberculosis en todo el mundo. Así la OMS estimó en 1990 que *Mycobacterium tuberculosis* causaba 7.5 millones de casos y 2.5 millones de muertes a nivel mundial, calculándose 90 millones de nuevos casos y 30 millones de muertes a lo largo de la década 1990-1999 si no se adoptaban las medidas correctoras<sup>35</sup>. Estas cifras, unidas a la aparición de brotes causados por cepas multirresistentes en grandes ciudades así como en comunidades cerradas, ha generado una necesidad de mejorar los métodos microbiológicos para el diagnóstico de la tuberculosis<sup>36,37</sup>. Esta mejora debe cumplir un doble objetivo: diagnosticar el mayor número de casos en el menor tiempo posible y la detección precoz de resistencias.

El denominado complejo *M.tuberculosis* que incluye *M.tuberculosis*, *M.bovis*, y *M.africanum*, con poder patógeno para el hombre se incluye en el grupo III, no cromógenas de crecimiento lento. En general, el crecimiento en los medios de cultivo habituales de *M.tuberculosis* es lento y requiere de 2 a 8 semanas o más para su detección. Este lento crecimiento influye tanto en la evolución crónica de la enfermedad como en la dificultad del diagnóstico microbiológico por el retraso que supone para su aislamiento .

El diagnóstico definitivo de la tuberculosis se basa en el aislamiento de *M.tuberculosis* de las muestras clínicas aunque se ve dificultado por el lento crecimiento del bacilo tuberculoso. Es necesario realizar el cultivo en todas las muestras patológicas ya que la sensibilidad del mismo es superior a la de la microscopia. Además el aislamiento del microorganismo permite realizar su identificación y determinar su sensibilidad frente a fármacos antituberculosos.

El diagnóstico microbiológico de la tuberculosis es un proceso que incluye los siguientes procedimientos:

- 1.- Recogida, transporte y procesamiento adecuados de la muestra. Las muestras recibidas en el laboratorio de microbiología para tinción y cultivo debería ser considerada rutinariamente como contenedoras de micobacterias y, por tanto, debe ser manipulada de forma segura. Tales muestras podrían provenir de pacientes infectados con cepas MDR de *M.tuberculosis*, las cuales harían dificultoso su tratamiento por parte del personal de laboratorio pudiendo ocurrir un accidente y ser infectado algún miembro del personal de laboratorio. La incidencia de tuberculosis en aquellos que trabajan con *M.tuberculosis* en el laboratorio es tres veces mayor que la incidencia entre personal de laboratorio que no trabaja con la bacteria<sup>47</sup>. Los procedimientos de seguridad propuestos en la guía de seguridad para los laboratorios deben de ser de obligado cumplimiento <sup>47,48</sup>.

- 2.- Homogeneización y de contaminación, de la muestra cuando sea necesario, mediante tratamientos como N-acetil-Cisteína e hidróxido sódico o Lauril sulfato entre otros.
- 3.- Visualización de los microorganismos mediante tinciones . Dos tipos de tinciones ácido-alcohol son usadas comunmente. La primera de ellas es la que utiliza carbol fucsina (Ziehl-Neelsen o Kiyoun). La tinción clásica de Ziehl Neelsen, que se viene utilizando desde hace más de un siglo, actualmente es imprescindible todavía<sup>49,50,51</sup>. El número de bacilos por mililitro de muestra requerido para que una tinción sea positiva<sup>52</sup> ha sido estimado entre 10.000 y 100.000. Sin embargo algunos laboratorios con experiencia pueden obtener tinciones positivas con sólo 1000 y 10.000 bacilos por mililitro. Otros autores estiman que la cantidad de bacilos por mililitro estaría entre 5000 y 50.000<sup>51,53,54</sup>.

El segundo tipo de tinción más usada es la tinción con fluorocromos de Auramina-Rodamina que se observa con microscopio de fluorescencia. Ésta técnica presenta igual sensibilidad pero reduce el tiempo de visualización<sup>49,50,51,53,54</sup>. Las tinciones negativas serían evaluadas en 1-2 minutos en vez de los 15 minutos requeridos para una muestra negativa teñida con el método de Ziehl-Neelsen <sup>54</sup>. A pesar de esto es aconsejable confirmar todos los resultados positivos con la tinción de Ziehl-Neelsen. Recientemente se ha incorporado la tinción de Naranja de Acridina con resultados similares a las dos anteriores <sup>57</sup>

- 4.- Aislamiento e identificación de *Mycobacterium tuberculosis*. Habitualmente para el aislamiento de *M. tuberculosis* se emplean tres tipos de medios son :  
medios biológicos con huevo (Löwenstein-Jensen, Coletsos),  
medios semisintéticos con agar ( Middlebrook 7H10 y 7H11 ), y  
medios líquidos (Dubos, Septi-Check).<sup>49,50,51,55</sup>.

En los medios de cultivo sólidos se requiere un período de incubación de 3 a 6

semanas para detectar crecimiento suficiente y proceder a la identificación del aislamiento. La identificación de *M.tuberculosis*, en un primer estadio se basa en las características morfológicas de las colonias, no producción de pigmento, tiempo que tarda en aparecer las colonias en los subcultivos, y propiedades bioquímicas<sup>54</sup>.

El primer paso en la identificación es confirmar la ácido-alcohol resistencia del microorganismo aislado. En segundo lugar se procede a la observación de sus características morfológicas y tiempo de crecimiento en el medio de cultivo, para posteriormente realizar la identificación del complejo *M.tuberculosis* mediante las siguientes pruebas bioquímicas<sup>58</sup>:

A) Prueba de la Niacina:

Se basa en la capacidad de ciertas micobacterias para producir ácido nicotínico en el curso de su crecimiento. Esta prueba es positiva para el complejo *M.tuberculosis*.

B) Reducción de Nitratos:

Se realiza gracias a la enzima nitrato-reductasa que cataliza el paso de nitratos a nitritos, y de éstos a nitrógeno. Esta prueba es también positiva para *M.tuberculosis*.

C) Prueba de la catalasa a 68°C:

Todas las micobacterias poseen actividad catalasa. Mediante ésta enzima descomponen el peróxido de hidrógeno. La mayoría de las micobacterias poseen dos tipos de catalasa, una termoestable y otra termolábil. El complejo *M.tuberculosis* posee solamente la enzima termolábil, siendo por tanto ésta prueba negativa.

Con estas tres pruebas definimos bioquímicamente el complejo *M.tuberculosis*, aunque en la rutina habitual es suficiente con una prueba de Niacina correctamente

realizada.

Actualmente la técnica de identificación más innovadora y rápida es la identificación mediante hibridación con sondas de ácidos nucleicos. Existen dos tipos de sondas: isotópicas y no isotópicas.

En 1987 fueron comercializadas por Gen Probe Inc. (San Diego, California) sondas de ácidos nucleicos para la identificación del complejo *M.tuberculosis* (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, y *M.microti*), *M.avium*, *M.intracellulare* y *M.kansasii*. Esta técnica utiliza una sonda de ADN marcada con  $^{135}\text{I}$ , complementaria del ARN-r del organismo diana. El ARN-r del microorganismo es liberado por la acción de un reactivo de lisis, calor y sonicación. Tras la hibridación con la sonda de ADN  $^{135}\text{I}$ , se forma un híbrido estable entre ésta y el ARNr. La reactividad del complejo es medida y el resultado calculado en porcentaje de ADN hibridado. Las principales limitaciones de la sonda isotópica es que utiliza material radiactivo, la inestabilidad de los reactivos (un mes), y el alto coste de los mismos.

Actualmente se utiliza una sonda no isotópica marcada con un ester de acridina unido a la cadena complementaria de ADN (Accuprobe, Gen Probe). El híbrido ADN-ester ARN-r se detecta por quimioluminiscencia, utilizando un luminómetro. Este sistema es altamente sensible y específico para identificar complejo *M.tuberculosis*, *M.avium*, *M.gordoniae*, *M.intracellulare* y *M.kansasii*. Tiene como ventajas su alta vida (6 meses), no utiliza radiactividad, y es menos costosa que las isotópicas<sup>164,167</sup>.

Este sistema de identificación por hibridación es fácil de realizar, exigen poco espacio para su ejecución y acortan significativamente el tiempo (2-3 horas) empleado en la identificación de las diferentes especies de micobacterias de interés clínico. El sistema AccuProbe ha revelado una sensibilidad cercana al 100% en la

identificación del complejo *M.tuberculosis*. Además puede ser aplicado a la detección de *M.tuberculosis* tanto en medios sólidos (1 ó 2 colonias) como a partir de los medios líquidos si se dispone de un número de microorganismos suficiente.

5.- Realización de las pruebas de sensibilidad a diferentes antimicrobianos.

Los métodos admitidos y más utilizados para la determinación de sensibilidad de *M.tuberculosis* a los antimicrobianos: el método de dilución en agar y el sistema radiométrico, se basan en el método de las proporciones y emplean una única (a veces 2-3) concentración crítica<sup>124</sup>. El sistema radiométrico<sup>59-77</sup> permite la determinación de la sensibilidad de *M.tuberculosis* frente a estreptomicina, isoniácida, rifampicina, etambutol, y pirazinamida obteniéndose los resultados en 3-8 días.

El sistema Etest®, método cuantitativo que determina la CMI mediante un gradiente exponencial del antibiótico, ha demostrado una excelente correlación con los métodos de referencia y dependiendo del inóculo utilizado se puede interpretar en un período de 5-10 días. Es sencillo, y no requiere aparataje y presenta la ventaja adicional de determinar la CMI<sup>137-140</sup>.

### 1.2.1. NUEVOS MÉTODOS DE CULTIVO DE *M.tuberculosis*

El diagnóstico micobacteriológico de laboratorio de los años 90 debe responder a los nuevos cambios ocurridos en el espectro clínico de la tuberculosis. La principal diferencia entre la tuberculosis y otras infecciones micobacterianas radica en el hecho de que el *M.tuberculosis* se transmite de persona a persona. Por este motivo es especialmente importante diagnosticar la tuberculosis lo antes posible, pues es una enfermedad compleja con amplias repercusiones legales y sociales. Los diagnósticos realizados a partir de evidencias de tipo clínico, radiológico, o histológico son sólo presuntivos siendo la detección, el aislamiento e identificación de *M.tuberculosis* en los productos patológicos del enfermo la única manera de establecer un diagnóstico de certeza.



Al amparo de las nuevas tecnologías y debido al incremento en la incidencia de la tuberculosis se hace necesario la búsqueda de técnicas diagnósticas más rápidas y sensibles.<sup>53,57</sup> El desarrollo de sistemas automatizados o semiautomatizados para el aislamiento de *M.tuberculosis* basados en la combinación de medios líquidos de cultivo y de distintos sistemas para la detección del crecimiento, ha favorecido la consecución parcial de los citados objetivos.

El sistema radiométrico BACTEC®460TB<sup>59-77</sup> es entre los métodos tradicionales el más rápido, permitiendo a partir de una muestra clínica el aislamiento (4-8 días) e identificación (3-6 días) de *M.tuberculosis* en 10-14 días. Este período de tiempo que se puede acortar aún más si la identificación de la especie se realiza mediante hibridación (3 horas) con sonda específica. Se dispone en la actualidad de sondas para la identificación de las especies de micobacterias más frecuentemente aisladas en muestras clínicas.

En los últimos años se han desarrollado diversos sistemas semiautomatizados o automatizados para la detección de *M.tuberculosis* en muestras clínicas como son: Bactec®460TB<sup>59-77</sup>, MGIT™<sup>78-103</sup> y MGIT 960<sup>104</sup>, sistema Bactec® 9000 MB<sup>105-114</sup>, ESP Culture System II<sup>115-116</sup>, MB/Bact Process System<sup>117-121</sup>, Bioargos, y sistema MB Redox<sup>122-123</sup>. Las evaluaciones preliminares de estos sistemas permiten concluir que son, con pequeñas diferencias entre sí, equiparables en su rendimiento en cuanto a sensibilidad y tiempo medio de detección (10-15 días) de *M.tuberculosis* en muestras clínicas y aunque su rendimiento global es inferior al sistema Bactec®460TB presentan la ventaja de no emplear isótopos radiactivos, por lo que paulatinamente lo irán sustituyendo<sup>86-141</sup>.

El sistema Bactec®460TB (Becton Dickinson Microbiology Systems), hoy día se considera un método tradicional en los laboratorios de Micobacteriología clínica, aunque su uso no se ha generalizado por los problemas inherentes a la utilización de isótopos radiactivos. Es un método considerado de referencia tanto para el aislamiento de *M.tuberculosis* en muestras clínicas como para la determinación de la sensibilidad a los tuberculostáticos. Este sistema es capaz de procesar automáticamente 60 muestras clínicas

en una hora e imprime los resultados. Se basa en la detección de CO<sub>2</sub> marcado con <sup>14</sup>C generado por el crecimiento bacteriano al metabolizar el ácido palmítico marcado con <sup>14</sup>C presente en el medio de cultivo (7H12). Este CO<sub>2</sub> es extraído del vial por el sistema Bactec®460TB, que mide su concentración y lo transforma en un registro gráfico como índice de crecimiento (IC) en una escala numérica de 0-999, que refleja la concentración de micobacterias presentes en la muestra <sup>59-77;125-136</sup>.

Utilizando el mismo principio se ha adaptado para la determinación de la sensibilidad a los tuberculostáticos. Compara los índices de crecimiento obtenidos en un vial de control de crecimiento sin antibióticos y con los alcanzados en los viales que contienen los principales tuberculostáticos <sup>124</sup>. Los índices de crecimiento se miden cada día después de la inoculación, y cuando en el vial de control se alcanza un determinado valor, el incremento sobre el índice del día anterior es comparado con los de los niveles de crecimiento en los viales que contienen los antimicrobianos.

El sistema Bioargos (Pasteur) es un sistema automático que realiza la gestión, incubación, y lectura de la concentración de CO<sub>2</sub> de los frascos a través del cristal por medio de un rayo láser. El medio de cultivo líquido que emplea es Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC (Oleato-Arginina-Dextrosa-Catalasa).

El sistema ATM (Antibiogram Test Mycobacterium-Pasteur) es un kit para determinar la sensibilidad de las micobacterias a los diferentes antibióticos. Es una adaptación del que el método convencional descrito por Cannetti y cols <sup>143</sup>. Esta adaptación afecta a los siguientes factores:

- a) Medio de cultivo: Usa medio líquido de Youmans en sustitución del medio sólido Löwenstein-Jensen original <sup>181-183</sup>.
- b) Expresión del crecimiento bacteriano: Se emplea un índice de crecimiento (GI) en sustitución del recuento del número de colonias crecidas.

El sistema ATM permite obtener el resultado entre los 5 a 8 días posteriores al cultivo.

El sistema Bact Alert (Organon Tecnica) consta de un medio líquido (Middlebrook 7H9 modificado), y de un incubador-lector que utiliza una tecnología de sensores colorimétricos. El MB/Bact Microbial Detection System, como así se denomina, emplea un sensor colorimétrico y refleja al monitor la presencia y producción de dióxido de carbono disuelto en el medio de cultivo. Si los microorganismos están presentes en la muestra, se produce dióxido de carbono al ser metabolizados los sustratos del medio de cultivo. Cuando esto ocurre, el color del sensor permeable al gas que se encuentra en el fondo de cada vial cambia de verde oscuro a amarillo brillante. Este cambio en la intensidad de luz del color da como resultado un aumento en unidades de reflectancia que es monitorizada por el sistema<sup>117-121</sup>. En la actualidad todavía no permite la realización de pruebas de sensibilidad.

El sistema MB REDOX (Heipha Diagnostica-Biotest) es un medio de Kirchner modificado enriquecido con suero, el cual contiene como autoindicador de crecimiento una sal de tetrazolio incolora. En el sistema Redox al crecer las micobacterias reducen la sal de tetrazolio a formazán cuyo color variará de rosa pasando por rojo a violeta. El formazán obtenido es insoluble y precipita en forma de gránulos en la superficie celular. Dado que *Mycobacterium tuberculosis* y algunas otras especies crecen en el medio Kirchner preferentemente en forma de uniones celulares (partículas) visibles macroscópicamente, es fácil detectarlas a simple vista por la tinción del formazán. En caso de recuento elevado de gérmenes, se pueden observar simultáneamente partículas teñidas de color rosa pasando por rojo a violeta y partículas blancas no teñidas<sup>122-123</sup>.

El sistema Bactec®460TB 9000MB (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md.) utiliza un indicador fluorescente sensible al oxígeno. La producción de fluorescencia está en función del consumo de oxígeno durante el metabolismo microbiano. La presencia de fluorescencia indica crecimiento de microorganismos<sup>105-114</sup>.

El sistema Esp® (AccuMed International, Inc.), basado en la medida manométrica de la producción de gas y consumo de oxígeno utiliza como medio de cultivo Middlebrook 7H9 modificado, y una plataforma de crecimiento micobacteriano que aumenta la superficie incrementando así la recuperación y la detección de las micobacterias. También estará en un futuro disponible para pruebas de sensibilidad<sup>115-116</sup>.

Por último disponemos del sistema MGIT™ (Mycobacterium Growth Indicator Tube-Becton Dickinson Microbiology Division), que consiste en un compuesto fluorescente incluido en una silicona en la parte inferior del tubo, el cual es sensible a la presencia de oxígeno disuelto en el caldo (Middlebrook 7H9 modificado). Inicialmente, la gran cantidad de oxígeno apaga las emisiones procedentes del compuesto y se puede detectar muy poca fluorescencia. Más tarde, los microorganismos que respiran activamente consumen el oxígeno y permiten que se observe la fluorescencia mediante el uso de un transiluminador ultravioleta de 365 nm o luz ultravioleta de onda larga (lámpara de Wood). El crecimiento puede ser detectado también por la presencia de turbidez no homogénea o pequeños gránulos o copos en el medio.

Este sistema también dispone de fármacos para las pruebas de sensibilidad<sup>144-160</sup> (Isoniacida, Rifampicina, Etambutol, y Estreptomina), y próximamente estará disponible un sistema para la incubación y lectura automática denominado Bactec®460TB MGIT™ 960<sup>104</sup> aunque en la actualidad puede realizarse manualmente.

En esencia todos estos nuevos sistemas se basan en la utilización de un medio de cultivo líquido, que aumenta la sensibilidad y acorta el tiempo de detección, y un sistema indicador del crecimiento bacteriano basado en el metabolismo de las micobacterias presentes en la muestra clínica. Todos estos sistemas han de evaluarse en comparación no sólo con los métodos tradicionales de aislamiento en medio sólido sino especialmente con el sistema Bactec®460TB, para comprobar que ofrecen la misma rentabilidad y rapidez que dicho sistema sin la utilización y problemas que conllevan los isótopos radiactivos.

Por todo lo anteriormente expuesto se comprueba, si se confirman las expectativas generadas con estos nuevos sistemas, que uno de los objetivos del CDC para el control de la tuberculosis como es el aislamiento e identificación de *M.tuberculosis* en un período de 10-14 días está prácticamente conseguido desde un punto de vista técnico, aunque todavía se deben introducir estos sistemas en la mayoría de los laboratorios de Micobacteriología clínica.

### 1.2.2. MÉTODOS MOLECULARES.

La entrada de los métodos de biología molecular a los laboratorios de Micobacteriología ha sido el segundo gran avance que se ha producido en la última década. La tecnología de amplificación de los ácidos nucleicos ha sido uno de los grandes logros de los últimos años, especialmente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que se ha incorporado de forma rutinaria en el laboratorio de Micobacteriología Clínica. Estas técnicas, teóricamente satisfacen los dos objetivos previos del CDC para el control de la tuberculosis, el diagnóstico rápido de la misma y detección precoz de las resistencias. Diferentes técnicas de amplificación se han aplicado a la detección de *M.tuberculosis* en muestras clínicas como son la PCR, amplificación ARNr, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), reacción de la ligasa y de la Q-B replicasa<sup>161-165</sup>. La exactitud y fiabilidad de estas técnicas dependen de

- un procesamiento óptimo de la muestra
- los métodos de detección de amplicones
- correcta amplificación de la diana
- prevención de contaminaciones y eliminación de inhibidores.

Dos son los sistemas comerciales Amplicor MTB®, Amplificación MTD® que se han aplicado y evaluado suficientemente, mientras que de un tercero LCxMTB® se ha comenzado su evaluación. En general su rendimiento global es similar al cultivo en cuanto a sensibilidad y especificidad, y su principal ventaja es la rapidez. Las técnicas artesanales de amplificación adolecen de falta de fiabilidad y reproductibilidad y es por ello que nos referimos a los métodos comercializados que en principio obvian estos problemas<sup>161</sup>.

Estos dos sistemas, comparados con el cultivo, son globalmente similares en su rendimiento con una sensibilidad cercana al 90% y especificidad del 98-99% en muestras respiratorias, y con cifras inferiores en muestras extrapulmonares. Ambas presentan prestaciones superiores en muestras baciloscopias positivas. Poseen un valor predictivo negativo (99%) tan elevado que pueden utilizarse como técnicas de discriminación

negativa aunque se detectan algunos falsos negativos por la presencia de distintos inhibidores en las muestras clínicas. El principal factor limitante a su uso rutinario es su coste elevado, por lo que deben valorarse muy cuidadosamente la relación costo/eficacia antes de incorporarlas al laboratorio. La mayor rentabilidad de las mismas se obtiene en las situaciones en que la rapidez del diagnóstico sea fundamental para el manejo del paciente, como es el caso de :

- meningitis tuberculosa
- pacientes muy graves con diagnóstico de probable tuberculosis en los que la terapia empírica estaría contraindicada
- pacientes con alta sospecha de tuberculosis con baciloscopias negativas en situaciones en las que las consecuencias de la transmisión del bacilo serían muy graves como pacientes inmunocomprometidos, cuidadores de niños, instituciones cerradas y cepas multirresistentes
- pacientes con baciloscopias positivas pero con clínica compatible con micobacteriosis no tuberculosa, la rápida confirmación de las mismas por estas técnicas permitiría un tratamiento precoz dirigido, así como eliminar las medidas de aislamiento respiratorio.

En general estas técnicas son complementarias a las tradicionales y muy útiles en situaciones muy concretas<sup>141-186</sup>. Inconvenientes destacables adicionales son que no permiten realizar las pruebas de sensibilidad y no proporcionan suficiente ADN para la realización de los análisis de los fragmentos de restricción hoy día esenciales para los estudios epidemiológicos.

#### **1.2.2.1. Métodos de identificación epidemiológica.**

La aplicación de las técnicas de biología molecular ha posibilitado la caracterización de las cepas circulantes en una población y profundizar en la epidemiología y la dinámica de transmisión de la tuberculosis así como de su patogenia e historia natural<sup>169</sup>. Se han descrito 5 elementos genéticos como marcadores epidemiológicos. Dos, son secuencias de inserción IS6110 e IS1081, los tres restantes

son secuencias cortas repetidas sin función fenotípica conocida y denominadas: DR (secuencia repetida directamente), PGRS (secuencia polimorfa repetitiva rica en GC), y la MPTR (secuencia repetida en tandem). El análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción de la IS6110 (RFLP) es el método de referencia para estudios epidemiológicos, aunque su utilidad se ve limitada en las cepas de *M.tuberculosis* que carecen de dicha IS o poseen un número de copias inferior a cinco. En estas circunstancias se han utilizado con éxito la amplificación y secuenciación del fragmento DR, y estudios del polimorfismo de la PGRS<sup>170</sup>.

#### 1.2.2.2. Detección de resistencias.

La caracterización reciente de los mecanismos moleculares de resistencia a los tuberculostáticos ha permitido conocer las alteraciones genómicas asociadas a la aparición de resistencias y por tanto su estudio por diferentes técnicas de biología molecular como la secuenciación de fragmentos ampliados por PCR, el análisis de los polimorfismos de los fragmentos de cadena única amplificados (PCR-SSCP) y la restricción de los fragmentos amplificados. El desarrollo y aplicación de estos métodos de determinación de la sensibilidad independientes del metabolismo y por tanto del crecimiento bacteriano permiten la obtención de resultados en un período de horas a dos días<sup>171</sup>. Más del 95% de las cepas resistentes a rifampicina presentan mutaciones en un fragmento pequeño (81pb) del gen *rpoB* que pueden detectarse rápidamente por SSCP e incluso por un sistema comercial INNOLiPA®<sup>172,173,174,175</sup>, y dado que la mayoría de las cepas multirresistentes lo son a rifampicina estos métodos pueden ser útiles en el manejo de la enfermedad tuberculosa. Desgraciadamente no disponemos en la actualidad de un método similar para poder ser aplicado a las cepas resistentes a isoniacida ya que son varios los genes implicados y así mismo se han descrito un gran número de mutaciones haciendo difícilmente aplicable estos métodos a la rutina diaria del laboratorio<sup>171</sup>.

En esta última década se han dedicado una gran cantidad de esfuerzos y recursos para profundizar en el conocimiento de la tuberculosis así como para su prevención. A pesar de estos grandes avances y su paulatina incorporación a la rutina del



laboratorio de micobacteriología clínica aún estamos lejos de haber resuelto de forma totalmente satisfactoria todos los problemas del diagnóstico microbiológico de la tuberculosis.

**EVALUACIÓN DEL NUEVO SISTEMA Mgit™ PARA EL AISLAMIENTO DE  
*Mycobacterium tuberculosis* EN MUESTRAS CLÍNICAS Y DETERMINACIÓN DE LA  
SENSIBILIDAD A LOS TUBERCULOSTÁTICOS**

---

---

***2.- JUSTIFICACIÓN DE ESTUDIO Y  
OBJETIVOS***

## 2.1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO:

La tuberculosis continua siendo uno de los principales problemas de salud de la humanidad. A partir de la segunda mitad de la década de los ochenta la tendencia progresivamente decreciente de esta enfermedad se quiebra produciéndose un incremento de los casos de tuberculosis en todo el mundo. Así la OMS estimó en 1990 que *Mycobacterium tuberculosis* causaba 7.5 millones de casos y 2.5 millones de muertes a nivel mundial, calculándose 90 millones de nuevos casos y 30 millones de muertes a lo largo de la década 1990-1999 si no se adoptan las medidas correctoras<sup>35</sup>. Estas cifras, unidas a la aparición de brotes causados por cepas multirresistentes en grandes ciudades así como en comunidades cerradas, ha generado una necesidad de mejorar los métodos microbiológicos para el diagnóstico de la tuberculosis<sup>36</sup>. Esta mejora debe cumplir un doble objetivo:

- a) Diagnosticar el mayor número de casos en el menor tiempo posible y
- b) Detección precoz de resistencias.

Los medios de cultivo para micobacterias no habían experimentado cambios importantes desde que Robert Koch realizó los primeros cultivos de micobacterias y desde que empezó a generalizarse el uso del medio de Löwenstein-Jensen. Estos medios de cultivo presentan como principal inconveniente la lentitud en la obtención de resultados.

El desarrollo de sistemas automatizados o semiautomatizados para el aislamiento de *M.tuberculosis* basados en la combinación de medios líquidos de cultivo y de distintos sistemas para la detección de crecimiento, ha favorecido la consecución parcial de ambos objetivos.

Al amparo de nuevas tecnologías, se ha hecho un considerable esfuerzo de investigación en la búsqueda de técnicas alternativas de diagnóstico microbiológico más rápidas y sensibles. Se han diseñado nuevos sistemas de aislamiento: radiométricos

(BACTEC®460TB Becton Dickinson Microbiology Systems) y los medios bifásicos no radiométricos (MB Septi-Check, F. Hoffman-La Roche). El sistema radiométrico Bactec®460TB es el más rápido, permitiendo a partir de una muestra clínica el aislamiento (4-8 días) e identificación (3-6 días) de *M. tuberculosis* en 10-14 días. Este período de tiempo que se puede acortar aún más si la identificación de la especie se realiza mediante hibridación (3 horas) con sonda específica GENPROBE®. En los últimos años se han desarrollado diversos sistemas semiautomatizados o automatizados para la detección de *M. tuberculosis* en muestras clínicas como son: BACTEC® 9000 MB, ESP® CULTURE SYSTEM, MB/Bact™ PROCESS SYSTEM, y BBL®Mgit™ manual (objeto de este trabajo) y el BBL®Mgit™960 (último en aparecer), que son con pequeñas diferencias entre sí, equiparables en su rendimiento en cuanto a sensibilidad y tiempo medio de detección (10-15 días) de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas, y aunque su rendimiento global es inferior al sistema BACTEC®460TB, presentan la ventaja de no emplear isótopos radiactivos, por lo que paulatinamente lo irán sustituyendo.

Por todo lo anteriormente expuesto se comprueba que uno de los objetivos del CDC para el control de la tuberculosis como es el aislamiento e identificación de *M. tuberculosis* en un período de 10-14 días está prácticamente conseguido desde un punto de vista técnico aunque todavía se deban introducir estos sistemas en la mayoría de los laboratorios de Microbiología clínica y realizar una evaluación exhaustiva.

Los métodos admitidos y más utilizados para la determinación de sensibilidad de *M. tuberculosis* a los antimicrobianos: el método de dilución en agar y el sistema radiométrico, se basa en el método de las proporciones y emplean una única (a veces 2-3) concentración crítica<sup>124</sup>. El sistema radiométrico permite la determinación de sensibilidad frente a estreptomycin, isoniacida, rifampicina, etambutol y pirazinamida obteniéndose los resultados en 3-8 días. Así mismo todos los nuevos sistemas de detección anteriores se están evaluando y adaptando para la determinación de la sensibilidad a los diferentes tuberculostáticos, pero no están disponibles para su aplicación de forma rutinaria (con la excepción del sistema Mgit™).

La entrada de los métodos de biología molecular a los laboratorios de Micobacteriología ha sido el segundo gran avance que se ha producido en la última década. La tecnología de amplificación de ácidos nucleicos ha sido uno de los grandes logros de los últimos años, especialmente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que se ha incorporado de forma rutinaria en el laboratorio de microbiología clínica. Estas técnicas, teóricamente satisfacen los dos objetivos previos del CDC para el control de la tuberculosis, el diagnóstico rápido de la misma y la detección precoz de las resistencias.

El laboratorio de Micobacteriología clínica deberá adaptarse a esta amplia disponibilidad de técnicas y la incorporación de las mismas deberá hacerse en función de sus posibilidades, de la demanda y presión asistencial que posean.

## 2.2. OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis es la evaluación global de un nuevo sistema no radiométrico el sistema Mgit<sup>TM</sup> (Mycobacterial Growth Indicator Tube) para el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* muestras patológicas y la utilidad de este sistema para la determinación de la sensibilidad a tuberculostáticos. Este objetivo principal se alcanzará a través de los siguientes objetivos parciales:

- 1.- Evaluación preliminar del sistema analizando el método de decontaminación utilizado así como la capacidad de permitir el crecimiento de las principales micobacterias de interés clínico, adaptabilidad a los métodos de identificación y tiempo necesario para la detección del crecimiento de las micobacterias.
- 2.- Estudio prospectivo del sistema Mgit<sup>TM</sup> para el aislamiento de *M. tuberculosis* en muestras clínicas seleccionadas durante un período de tres meses. Evaluación de dicho sistema en cuanto a rentabilidad diagnóstica y tiempos de detección mediante comparación con los dos sistemas utilizados de forma rutinaria en la Sección de Micobacteriología del H.U.V. Macarena, el sistema radiométrico Bactec®460TB y el aislamiento en medio Löwestein-Jensen con piruvato.
- 3.- Evaluación del sistema Mgit<sup>TM</sup> en la determinación de la sensibilidad de *M. tuberculosis* a los tuberculostáticos de primera línea: estreptomina, isoniacida, rifampicina y etambutol. Esta evaluación se completará mediante la comparación de sus resultados con los obtenidos en un método de referencia: el sistema radiométrico

Bactec®460TB. En caso de discrepancias éstas serán resueltas mediante el estudio de la sensibilidad por el método de las proporciones en medio Löwestein-Jensen.

4.- Aplicación de un método de amplificación e hibridación en las cepas de *M.tuberculosis* resistentes a rifampicina, que nos identificará las mutaciones encontradas en el gen *rpoB* que confieren dicha resistencia. Así mismo los resultados obtenidos serán utilizados en la validación de los resultados de las pruebas de sensibilidad a rifampicina obtenidos por los métodos basados en el crecimiento de *M.tuberculosis*.

**EVALUACIÓN DEL NUEVO SISTEMA Mgit™ PARA EL AISLAMIENTO DE  
*Mycobacterium tuberculosis* EN MUESTRAS CLÍNICAS Y DETERMINACIÓN DE LA  
SENSIBILIDAD A LOS TUBERCULOSTÁTICOS**

---

---

***3.- MATERIAL Y MÉTODOS***

### 3.1. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES POR *M.tuberculosis*: BACILOSCOPIA Y CULTIVO

#### 3.1.1.- Cepas control y muestras clínicas:

##### a) Cepas de control:

En la evaluación preliminar del sistema Mgit™ así como de los métodos de decontaminación utilizados en dicho sistema se emplearon diversas cepas control procedentes de colecciones internacionales así como de la colección de aislamientos clínicos de Dpto de Microbiología.

##### I) Cepas patrón:

- *M.tuberculosis*, ATCC 27294.
- *M.kansasii*, ATCC 12478.
- *M.fortuitum*, ATCC 6841.
- *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853.
- *Staphylococcus epidermidis*, ATCC 12228.

##### II) Cepas clínicas:

- M.avium*: Dos cepas
- M. intracellulare* : Dos cepas
- M.kansasii*: Dos cepas
- M. fortuitum* : Dos cepas
- M. scrofulaceum*: Una cepa

##### b) Muestras clínicas

Durante el período comprendido entre Octubre y Diciembre de 1995 se procesaron en la Sección de Mycobacterias del Hospital Universitario Virgen Macarena un total de 1071 muestras clínicas, siendo seleccionadas un total de 310 para la realización del estudio. Doscientas cuarenta (77,42 %) de ellas fueron de origen respiratorio, y las setenta restantes (22,58%%) de distinta procedencia clínica como se refleja a continuación.

- Esputos ..... 221.
- Aspirado bronquial ..... 19.
- Catéter Telescópico ..... 1.



- Cepillo bronquial ..... 1.
- A.Gástrico ..... 21.
- A.Abscesos ..... 9.
- Orinas ..... 24.
- Heces ..... 4.
- Tejidos ..... 5.
- Líquido Cefalorraquídeo ..... 3.
- Líquido Sinovial ..... 1.
- Líquido Ascítico ..... 1.

### 3.1.2. Soluciones y Tinciones

#### D) Solución de Decontaminación <sup>176,177</sup>:

La decontaminación de las muestras clínicas se llevó a cabo con un kit comercial de N-acetil-L-cisteína-NaOH al 4% (NALC) BBL® MycoPrep™. Este preparado consta de dos soluciones:

N-acetil-L-cisteína-NaOH al 4%:

- Citrato sódico ..... 29 g.
- Hidróxido sódico ..... 40 g.
- N-acetil-L-cisteína ..... 5 g.
- Agua destilada estéril ..... 1000 ml.

Solución tampón fosfato:

- Fosfato disódico ..... 2,37 g.
- Fosfato monopotásico ..... 2,27 g.
- Agua destilada estéril ..... 500 ml.
- pH final: ..... 6,8

#### II) Colorantes de la tinción de Ziehl-Neelsen<sup>180</sup>:

- Fucsina fenicada

- Alcohol-clorhídrico:

- Ácido clorhídrico concentrado ..... 3 ml.
- Alcohol etílico 95% ..... 97 ml.

- Azul de Metileno

Cloruro de azul de metileno o azul de metileno hidrosoluble en agua destilada al 0,3% (0,3 g en 100 ml).

### III) Sonda para la identificación *Mycobacterium* complex

-La identificación de los aislamientos clínicos se realizó mediante hibridación con sonda de ADN para el complejo *M.tuberculosis*, Accuprobe (Gen Probe, San Diego, CA).

-Se utilizaron los materiales y reactivos suministrados por el fabricante.

### 3.1.3. Medios de cultivo y suplementos:

#### D) Tubos Löwenstein-Jenssen con Piruvato <sup>49,181</sup>:

- Fosfato monopotásico . . . . . 0,15 g.
- Sulfato magnésico . . . . . 0,015 g.
- Citrato magnésico . . . . . 0,0375 g.
- Asparagina . . . . . 0,225 g.
- Glicerol . . . . . 0,75 ml.
- Fécula de patata . . . . . 2 g.
- Verde malaquita (2%) . . . . . 1,25 ml.
- Huevo . . . . . 60 ml.
- Piruvato sódico . . . . . 2 mcg/ml.
- Agua destilada . . . . . 37,5 ml.

#### II) Viales 12B Sistema Bactec <sup>182</sup>:

- Middlebrook 7H9 caldo . . . . . 0,47%.
- Hidrolizado de caseína . . . . . 0,10%.
- Albúmina bovina . . . . . 0,50%.
- Catalasa . . . . . 192 unidades.
- Carbono 14. . . . . 4 (Ci).
- Agua desionizada (completar) . . . . . 4 ml.
- pH final . . . . . 6,8+/-0,2.

### III) Tubos Indicadores de Crecimiento de Micobacterias (Mgit™)<sup>182,183</sup>:

- Indicador fluorescente . . . . . 110 µl.
- Base de caldo modificado Middlebrook 7H9.. . . . 5,9 g.
- Peptona de caseína . . . . . 1,25 g.
- Middlebrook 7H9:
  - Sulfato amónico . . . . . 0,5 g.
  - Ácido L-glutámico. . . . . 0,5 g.
  - Citrato sódico . . . . . 0,1 g.
  - Piridoxina . . . . . 0,001 g.
  - Fosfato disódico. . . . . 2,5 g.
  - Fosfato monopotásico . . . . . 2,5 g.
  - Citrato de hierro amoniacal . . . . . 0,04 g.
  - Sulfato de magnesio . . . . . 0,05 g.
  - Cloruro de calcio . . . . . 0,0005 g.
  - Sulfato de zinc . . . . . 0,001 g.
  - Sulfato de cobre . . . . . 0,001 g.

### IV) Suplementos

#### 1.- OADC:

Fórmula por litro de agua purificada:

- Albúmina bovina . . . . . 50,0 g.
- Dextrosa . . . . . 20,0 g.
- Catalasa . . . . . 0,03 g.
- Ácido oléico. . . . . 0,6 g.

#### 2.- Solución antibiótica PANTA para sistema Bactec®460TB:

Fórmula por frasco liofilizado:

- Polimixina B . . . . . 10.000 unidades.
- Anfotericina B. . . . . 1.000 mcg.
- Ácido Nalidixico. . . . . 4.000 mcg.
- Trimetoprima . . . . . 1.000 mcg.
- Azlocilina . . . . . 2.000 mcg.
- Fluido de reconstitución . . . . . 5 ml.

#### 3.- Solución antibiótica PANTA para sistema Mgit™:

Fórmula por frasco liofilizado:

- Polimixina B ..... 6.000 unidades.
- Anfotericina B ..... 600 mcg.
- Ácido nalidíxico. .... 2.400 mcg.
- Trimetroprima ..... 600 mcg.
- Azlocilina. .... 1.200 mcg.
- Agua estéril ..... 3 ml.

4.- Fluido reconstitución:

- Estearato de polioxietileno(POES) ..... 4 mg.
- Agua destilada ..... 1 ml.

### 3.1.4. Baciloscopia

#### I) Preparación de las muestras.

La extensión para la visualización microscópica se realizó a partir de los sedimentos obtenidos después de centrifugar a 3000 r.p.m./20-30 minutos en las muestras líquidas potencialmente no contaminadas (Fluidos corporales estériles), contaminadas (Orina, jugo gástrico, etc..) y esputos inducidos. Las extensiones se realizaron directamente de las muestras de esputo y broncoaspirados (BAS), tomando de la zona más purulenta de las mismas, mientras que en las muestras sólidas (tejidos, biopsias, etc...) se hizo a partir del homogeneizado triturado de las muestras. En ocasiones se realizaron improntas directamente sobre el portaobjetos.

#### II) Preparación de los frotis para microscopía.

Se siguieron las normas dadas por la Unión Internacional contra la Tuberculosis (UICT).

De la porción más purulenta de la muestra, se tomó con un asa bacteriológica una mínima cantidad que se depositó sobre un portaobjetos.

Se realizó la extensión cubriendo las tres terceras partes del portaobjetos.

Una vez realizada la extensión se dejó secar dentro de la cabina de seguridad.

La fijación se realizó colocando los portaobjetos sobre una placa calefactora de 70-80°C durante 10-15 minutos.

Posteriormente se realizó la tinción.

### III) Tinción Ziehl-Neelsen <sup>184,185</sup>.

Cubrir la preparación con Fucsina fenicada y calentar suavemente por debajo del portaobjetos con una torunda encendida impregnada de alcohol hasta que se desprendan vapores sin permitir que hierva.

Repetir la operación 2-3 veces.

Dejar enfriar durante 5 minutos y lavar con agua.

Decolorar con ácido alcohol clorhídrico hasta que el porta quede transparente, eliminándose el color rojo (3-5 minutos).

Lavar con agua, y contracolorar con Azul de Metileno durante 5-10 minutos. Lavar con agua, y dejar secar al aire.

**Lectura:** Se realiza con objetivo de inmersión (1000x). Los bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) se tiñen de color rojo sobre fondo azul. Para la lectura de las baciloscopias se situó el objetivo correspondiente a la tinción en un extremo de portaobjetos, recorriendo los campos microscópicos existentes a lo largo de una línea (aproximadamente 100 campos)<sup>48</sup> y se contabilizó el número de BAAR encontrados. Una vez contados 50 BAAR en una línea no se continuó visualizándose la extensión y se emitió el informe > 50 BAAR/1 línea.

Si a lo largo de una línea se encuentran menos de 50 BAAR pero más de 10, también se detuvo la lectura.

Si a lo largo de una línea se observaron menos de 10 BAAR, se continuó examinando la extensión, visualizándose en este caso otras dos líneas, informándose el número de BAAR observado en estas tres líneas.

### 3.1.5. Cultivo: Siembra e inoculación

#### D) Cepas control :

#### A) Preparación del inóculo para *M.kansasii* ATCC 12478 y *M.fortuitum* ATCC 6841.

- 1.- Recoger con un asa estéril tantas colonias como sea posible de un subcultivo joven (14 días) en medio de Löwenstein-Jensen intentando no coger medio sólido y resuspender en un tubo estéril de 16.5x128mm con tapón de rosca conteniendo de 8-10 bolitas de cristal y 4ml de caldo 7H9.
- 2.- Agitar durante 2-3 minutos en el vortex para deshacer los grumos grandes y la suspensión alcance una turbidez superior al estándar 1 de MacFarland. Dejar reposar la suspensión durante 20 minutos. Transferir el sobrenadante a un segundo tubo de 16.5x128mm con tapón y dejar reposar durante otros 15 minutos (evitar transferir ningún sedimento). Finalmente comparar y ajustar la suspensión al 0.5 MacFarland.
- 3.- Preparar una dilución 1/5 depositando 1 ml de la suspensión en 4ml de solución salina estéril. Mediante diluciones seriadas alcanzar una dilución final 1/1000.
- 4.- Inocular 0.5ml de la dilución final (1/1000) de cada una de las cepas *M.kansasii* y *M.fortuitum* en un tubo Mgit suplementado con PANTA y OADC. Cerrar y mezclar cada tubo invirtiendolos varias veces.

#### B) Preparación del inóculo de *M.tuberculosis* ATCC 27294:

Se realiza de la misma forma que en la sección anterior, la única diferencia estriba que se utiliza como inóculo una dilución final de 1/10 de *M.tuberculosis*.

#### C) Preparación del inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228:

Tras un período de incubación de 24-48 horas en Caldo común, se procede a la preparación en solución salina estéril de una suspensión ajustada al estándar 0.5 de MacFarland. Inocular 0.5ml en dos tubos Mgit, el primero suplementado con PANTA y OADC, y el segundo sólo con OADC.

#### **D) Preparación del inóculo de las cepas clínicas de colección:**

En las nueve cepas clínicas de colección la preparación del inóculo se realizó como en el apartado A.

#### **Lectura :**

Se procedió a la lectura manual diaria de los tubos Mgit™ inoculados con las diferentes cepas control utilizando un transiluminador de luz ultravioleta de longitud de onda 365nm. La fluorescencia emitida se comparaba con la obtenida de un control positivo y un control negativo.

#### **Control positivo:**

Añadir 5ml de solución de sulfito sódico al 0,4% (0.4g en 100ml de agua destilada estéril) a un tubo Mgit™ vacío. Cerrar el tapón y dejarlo a temperatura ambiente durante una hora. No incubar. Etiquetar el tubo como control positivo y grabar la fecha.

Este control positivo puede ser utilizado durante más de 4 semanas si se conserva a temperatura ambiente.

#### **Control negativo:**

Se utiliza un tubo Mgit™ sin inocular.

### **II) Muestras clínicas**

#### **A) Procesamiento de la muestra:**

1.- Depositar un máximo de 10ml de la muestra obtenida en un tubo de centrifuga con tapón de rosca de 50 ml. Añadir en igual volumen al de la muestra la solución de NALC. Cerrar el tubo y agitar en vortex durante 5 a 20 segundos cada tubo, e invertir para asegurarse que la NALC contacte con todas las superficies del tubo y del tapón.

2.- Dejar reposar la muestra durante 15 a 20 minutos. Transcurrido este tiempo completar hasta 45ml con tampón fosfato estéril pH 6,8. Agitar a mano para mezclar.

3.- Concentrar la muestra en una centrifuga a una velocidad de 3000 x g durante 15 minutos. Cuidadosamente decantar el líquido sobrenadante y resuspender el sedimento

en 1 a 3 ml de tampón fosfato utilizando una pipeta Pasteur estéril. Esta suspensión será inoculada en los diferentes medios de cultivo.

**B) Inoculación tubos de Löwenstein-Jensen con Piruvato:**

1.- Extraer los tubos conservados a 4°C y dejar a temperatura ambiente.

2.- Inocular con 0,2 ml de la muestra previamente tratada, inundando con el inóculo cuidadosamente la superficie de la pendiente. Los tubos se incuban a una temperatura de 37 °C durante 8 semanas.

**Lectura e interpretación:** Se examinan 1 vez por semana, observando si aparece o no crecimiento.

**C) Inoculación de los viales Bactec 12B:**

1.-Añadir 0,1ml de la solución PANTA a cada vial Bactec.

2.-Inocular cada vial Bactec con 0,5ml de la muestra previa y convenientemente tratada.

3.-Desinfectar el tapón de cada vial inoculado con una solución al 5% de fenol, seguida por otra de alcohol de 70%.

4.-Incubar los viales a 35°C±1°C en la oscuridad y sin agitación.

**Lectura e interpretación:** El ácido palmítico marcado con <sup>14</sup>C presente en el medio de cultivo es metabolizado por la micobacteria en su crecimiento, y el <sup>14</sup>C liberado en forma de CO<sub>2</sub> marcado. Este es extraído del vial por el sistema BACTEC y su actividad registrada como índice de crecimiento (GI) en una escala numérica del 0-999. Si la actividad medida es mayor de 30 GI, indica crecimiento. Los valores de GI son directamente proporcionales a la cantidad de crecimiento del medio.

Tras 2 – 4 días de incubación, se procede a la lectura de los viales 12B en el instrumento Bactec®460TB. Se realizan de cada vial inoculado tres lecturas en las dos primeras semanas, y luego una vez a la semana hasta completar 6 semanas de incubación.



Si un vial es positivo (GI>10 indica metabolismo bacteriano), continuar leyendo diariamente. Cuando se alcance un GI igual o superior a 100, se realizará una tinción de Ziehl-Neelsen para comprobar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes. Posteriormente se procede a la identificación mediante hibridación con sondas .

Confirmada la identificación del aislamiento como *M.tuberculosis* se determinará su sensibilidad a los tuberculostáticos.

#### **D) Inoculación de los tubos Mgit™:**

##### **Principio del Método:**

Indicador fluorescente unido a la silicona situada en el fondo del tubo. El compuesto fluorescente es Cloruro pentahidratado de 4,7-difenil-1,109-Fenantrolina Rutenio en una base de silicona. Éste compuesto fluorescente es sensible a la presencia de oxígeno del medio. Inicialmente la cantidad de oxígeno disuelta en el medio es lo suficientemente alta como para impedir la emisión de fluorescencia por este compuesto.

La presencia de Micobacterias en el medio consumirá este oxígeno, y esto permitirá observar la fluorescencia mediante el uso de un transiluminador ultravioleta de 365 nm o con una lámpara de Wood.

**Control positivo y negativo:** descritos en la sección I “lectura” de las cepas control.

##### **Inoculación:**

Destapar el tapón y añadir asepticamente 0,5ml de OADC. Añadir asepticamente 0,1ml de PANTA reconstituido con 3ml de agua estéril. Para unos mejores resultados, añadir el enriquecimiento OADC y la mezcla antibiótica justo antes de inocular el tubo con la muestra.

Añadir 0,5ml de la muestra, cerrar el tubo, y mezclar bien.

Limpiar los tubos y los tapones con un desinfectante. Incubar a 37°C. Leer los tubos diariamente comenzando en el día 2º.

### **Lectura de los tubos:**

Se utilizará un transiluminador de luz UV de 365nm. Las micobacterias activas respiran oxígeno consumiéndolo, permitiendo ver la fluorescencia tanto en el fondo, como en el menísco del tubo.

El crecimiento también puede observarse por la presencia de una muy ligera turbidez no homogénea, o pequeños gránulos o copos en el propio medio líquido.

### **3.1.6. Análisis estadístico:**

Considerando como casos todas las muestras en las que se aisló *M. tuberculosis* independientemente del sistema (Mgit™, Bactec®460TB y Löwestein-Jensen) determinamos la sensibilidad de los tres métodos de aislamiento. Aplicamos la prueba de la t de Student para variables impareadas, para ver si existía correlación estadística entre los sistemas empleados así como con objeto de evaluar las diferencias en los tiempos de detección. El nivel de significación estadístico empleado fue del 95% ( $p < 0,05$ ). Para ello se utilizó el paquete estadístico Epi-Info Versión 5.

### **3.1.7. Identificación de los aislamientos mediante hibridación con sonda:**

Este sistema está basado en el uso de sondas de ADN complementarias de un ARNr específico. Las micobacterias son lisadas por sonicación. El ADN que ha sido marcado con un sustrato quimioluminiscente se combina con el ARNr del microorganismo y forma un híbrido estable ADN-ARN. La quimioluminiscencia producida por el híbrido es medida en un luminómetro.

#### **A) Identificación mediante hibridación con sonda a partir del crecimiento en medio sólido (Löwestein-Jensen) <sup>167</sup>:**

Tras la identificación presuntiva de la colonia obtenida en el medio sólido se realiza una tinción de Ziehl-Neelsen para confirmación de la presencia de micobacterias. La identificación la realizamos mediante hibridación con sonda de ADN para el complejo *M. tuberculosis*, Accuprobe® (Gen Probe, San Diego, CA), siguiendo las normas de la casa comercial. Realizada la hibridación, se procede a la lectura de los resultados mediante un luminómetro LEADER™ (Gen Probe) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados son considerados positivos cuando la lectura es mayor de 30.000 RLU (Unidades de luz relativa).

**B) Identificación mediante hibridación con sonda a partir del crecimiento en los frascos 12B positivos <sup>166</sup>:**

Se realizó en aquellos viales que presentaron un índice de crecimiento  $\geq 100-200$  y baciloscopia positiva.

Procesamiento: Centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos en tubos de 10ml de tapón de rosca de 1ml del vial 12B positivo. A partir del sedimento obtenido tras decantar el sobrenadante se procedió a la técnica habitual de identificación mediante hibridación con sonda de ADN.

**C) Identificación mediante hibridación con sonda a partir del crecimiento en los tubos Mgit positivos <sup>168</sup>:**

Se realizó en aquellos tubos que presentaron fluorescencia, turbidez no homogénea, y baciloscopia positiva.

Procesamiento: Centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos en tubos de 10ml de tapón de rosca de 100 ul de un tubo Mgit<sup>TM</sup> positivo. A partir del sedimento obtenido tras decantar el sobrenadante se procedió a la técnica habitual de identificación mediante hibridación con sonda de ADN.

### **3.2. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A TUBERCULOSTÁTICOS**

#### **3.2.1. Cepas utilizadas en el estudio:**

En la valoración de los dos sistemas de determinación de sensibilidad a los tuberculostáticos se utilizaron tres grupos de cepas.

- a) **Grupo I:** Se utilizaron 24 cepas de *M.tuberculosis* aisladas durante los años 1993 (5 cepas), 1994 (9 cepas) y 1995 (10 cepas) con la característica de presentar resistencia a uno ó más de los tuberculostáticos probados. Doce resistentes a isoniacida (INH) y cinco resistentes a rifampicina (RIF). Entre las multiresistentes: cinco resistentes a INH y RIF, una cepa resistente a SM y RIF, y otra resistente a INH y ET,

b) **Grupo II:** Cepas aisladas en los meses de 1996 en los que se evaluó prospectivamente el sistema Mgit como método de aislamiento, y fueron un total de 28. El total queda como se muestra en la tabla de abajo.

Fármacos	Sensibles	Resistentes	Total	Multirresistentes	NºCepas
SM	51	1	52	SM/RIF	1
INH	25	27	52	INH/RIF	12
RIF	33	19	52	INH/ET	1
ET	50	2	52		

c) **Grupo III:** Se incluyeron cepas patrón como control de calidad del antibiograma las siguientes cepas de colecciones internacionales:

- Mycobacterium tuberculosis* H37rv Sensible a todos los tuberculostáticos.
- Mycobacterium tuberculosis* ATCC 35838, resistente a Rifampicina.
- Mycobacterium tuberculosis* ATCC 35822, resistente a Isoniacida.
- Mycobacterium tuberculosis* ATCC 35820, resistente a Estreptomina.
- Mycobacterium tuberculosis* ATCC 35837, resistente a Etambutol.

### 3.2.2. Medios de cultivo:

#### I) Medio Bactec 12B:

La realización del antibiograma en el sistema radiométrico Bactec®460TB se hizo en viales con medio 12B de composición descrita anteriormente. Los antibióticos se incorporaron a los viales 12B en las siguientes concentraciones:

Antibióticos	Conc. inicial	Conc. final
-Estreptomina	240 µg/ml.	6,0 µg/ml.
-Isoniacida	4 µg/ml.	0,1 µg/ml.
-Rifampicina	80 µg/ml.	2,0 µg/ml.
-Etambutol	300 µg/ml	7,5 µg/ml.

## II) Medio Mgit™:

La composición del medio de los Mgit™ suplementado con OADC es idéntica a la descrita anteriormente para el aislamiento de *M.tuberculosis*. Los antibióticos se incorporaron a los tubos con Mgit™ en las siguientes concentraciones.

Antibióticos:	Conc. inicial	Conc. final
-Estreptomicina . . . . .	40µ g/ml.	0,8µg/ml.
-Isoniacida. . . . .	.5µg/ml.	0,1µg/ml.
-Rifampicina . . . . .	50µg/ml.	1,0µg/ml.
-Etambutol. . . . .	.175µg/ml.	3,5µg/ml.

## III) Medio Coletsos 49:

Composición:

-Fosfato monopotásico. . . . .	.0,15g.
-Sulfato de magnesio. . . . .	0,015g.
-Citrato de magnesio . . . . .	.0,0375g.
-Asparagina. . . . .	0,225g.
-Piruvato sódico. . . . .	0,1g.
-Glutamato sódico. . . . .	0,1g.
-Tornal. . . . .	0,025g.
-Cenizas de antracita. . . . .	0,01g.
-Solución oligodinámica. . . . .	0,1ml.
-Glicerol . . . . .	0,75ml.
-Verde malaquita. . . . .	1ml.
-Fécula de patata. . . . .	1g.
-Agua destilada . . . . .	27,5ml.
-Oseína al 4%. . . . .	10ml.
-Huevo. . . . .	.50ml.
-Yema. . . . .	12,5ml.

Antibióticos:

La realización del antibiograma se llevó a cabo utilizando 2 tubos con medio Coletsos, pH 7,10 con dos concentraciones distintas para cada antibiótico:

-Estreptomicina. . . . .	.4 y 10µg.
--------------------------	------------

- Isoniacida. . . . . 0,2 y 10 $\mu$ g.
- Rifampicina. . . . . 20 y 40 $\mu$ g.
- Etambutol. . . . . .2 y 3 $\mu$ g.

El control del inóculo se realizó en dos tubos testigos sin antibiótico.

### 3.2.3.Determinación de la sensibilidad mediante sistema radiométrico

El principio básico de la determinación de susceptibilidad del Bactec radiométrico para micobacterias es similar al utilizado en el procedimiento de aislamiento. Cuando las micobacterias crecen en el medio 7H12 que contiene el sustrato marcado con  $^{14}\text{C}$ , se produce  $^{14}\text{CO}_2$ . La cantidad de  $^{14}\text{CO}_2$  detectado refleja la cantidad de crecimiento en el vial, y es expresado en términos de “Índice de Crecimiento”(GI). Cuando un fármaco antituberculoso es adicionado al medio, no habrá crecimiento si el microorganismo es sensible, y por contra si lo hay será resistente.

- 1.- El inóculo se prepara a partir de un vial Bactec positivo con un GI igual o mayor de 500. Este inóculo se usa directamente para la determinación de la sensibilidad. Si el valor de GI es mayor de 800, homogeneizar el cultivo y diluir al 1:2 añadiendo.
- 2.- Para cada aislado, etiquetar un vial 12B para cada fármaco, y un vial de control e inocular 0,1ml de cada fármaco reconstituido en cada vial debidamente etiquetado.
- 3.- Inocular 0,1ml de la suspensión bacteriana en cada vial.
- 4.- Para preparar el control, diluir el resto de la suspensión bacteriana al 1:100, adicionando 0,1ml a 9,9ml de suplemento de dilución. Mezclar bien, y añadir 0,1ml en el vial de control.
- 5.- Después de la inoculación, leer todos los viales en el instrumento para introducir una atmósfera de un 5-10%  $\text{CO}_2$ .
- 6.- Limpiar los tapones con fenol al 5% y alcohol al 70% e incubar los viales a  $37^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$  en la oscuridad y sin agitación.

- 7.- Leer diariamente, e interpretar los resultados cuando el GI del vial de control sea  $\geq 30$ .

### **.3.2.4. Determinación de la sensibilidad mediante sistema Mgit™**

#### **I. Cepas de control:**

##### **A) Preparación del inóculo a partir de Löwenstein-Jensen:**

- 1.- Añadir 4ml de caldo 7H9 en un tubo estéril de 16.5x128 mm con tapón conteniendo 8-10 bolas de cristal.
- 2.- Recoger con un asa estéril tantas colonias como sea posible de un subcultivo joven (14 días) en medio de Löwenstein-Jensen intentando no coger medio sólido y resuspender en un tubo estéril de 16.5x128mm con tapón de rosca conteniendo de 8-10 bolitas de cristal y 4ml de caldo 7H9.
- 3.- Agitar durante 2-3 minutos en el vortex para deshacer los grumos grandes y la suspensión debe alcanzar una turbidez superior al estandar 1 de MacFarland. Dejar reposar la suspensión durante 20 minutos. Transferir el sobrenadante a un segundo tubo de 16.5x128mm con tapón y dejar reposar durante otros 15 minutos (evitar transferir ningún sedimento). Finalmente comparar y ajustar la suspensión al 0.5 MacFarland.
- 4.- Preparar una dilución 1/5 depositando 1 ml de la suspensión en 4ml de solución salina estéril.

##### **B) Determinación de la sensibilidad**

-Inocular un tubo Mgit™ con 0.5ml del inóculo (dilución 1:5), al cual se le ha añadido previamente 0.5ml de OADC. Incubar a 37°C.

-Se debe de utilizar un tubo de Mgit™ con fluorescencia positiva de dos días máximo. Agitar éste tubo en el vortex durante 10 segundos.

-Pipetear 1.0ml de suspensión del tubo en 4ml de agua salina estéril (dilución al 1:5). El inóculo está listo.

-Preparar un control positivo y otro negativo.

-Etiquetar 5 tubos Mgit™ para cada aislado, uno como control de crecimiento y los cuatro restantes con las siglas de los tuberculostáticos Mgit™ SM (estreptomycin), Mgit™ INH(isoniacida), Mgit™ RIF (rifampicina), y por último Mgit™ EMB (etambutol).

-Añadir 0.5ml de Mgit™ OADC a cada tubo.

-Añadir 0.1ml de las soluciones de cada fármaco (previamente reconstituidos con 3ml de agua estéril) a sus respectivos tubos etiquetados. El tubo de control no contiene antibiótico.

-Inocular de cada aislado 0.5ml de la dilución 1:5 en cada uno de los cinco tubos. Limpiar los tubos con desinfectante.

-Incubar a 37°C.

#### **Lectura e interpretación de los resultados:**

-Colocar los tubos en el transiluminador a partir del tercer día, y comparar con los tubos de control positivo y negativo.

-Si la fluorescencia del tubo de control de crecimiento es parecida al tubo de control positivo, se registra como control de inóculo positivo. El día en el que el control de crecimiento es positivo, debe de considerarse "Día 0" para el propósito de interpretación de los tubos que contienen los fármacos. Registrar el día y la fecha de la positividad.

-Si el tubo de control de crecimiento (inóculo) no tiene fluorescencia, o ésta se parece más a la del control negativo, reincubar los tubos y leer diariamente hasta el día 12. Si transcurrido dicho tiempo el tubo de control continua negativo, desechar los tubos de ese aislado y repetir todo el proceso.

-Si es positivo el día 12, se guardarán los tubos hasta el día 14, y se interpretaran los resultados diariamente.



-El día en el que el tubo de control de crecimiento es positivo (Día 0), leeremos los tubos Mgit™ conteniendo los fármacos.

-Se interpretará como sensible si los tubos conteniendo los fármacos no presentan fluorescencia transcurridos dos días de haber dado positivo el tubo de control de crecimiento.

-Se interpreta como resistente si aparece fluorescencia en los dos días siguientes de haber aparecido en el tubo de control. Cuando se interprete resistencia a alguno de los fármacos, se dará por terminada la lectura del tubo con el fármaco que ha dado fluorescencia.

-Cuando el tubo Mgit™ de control de crecimiento es positivo en el fin de semana y los tubos no se han leído durante el mismo, los resultados de resistencia podrán ser informados el lunes si los tubos conteniendo los fármacos son positivos. Sí el tubo de control positivo es positivo, pero los tubos conteniendo los fármacos son negativos, entonces se considerará el lunes como Día 1 de tubo de control, y los tubos con los fármacos se consideraran sensibles si no aparece fluorescencia en los dos días siguientes.

En la tabla inferior podemos ver un ejemplo:

NºCEPA	MGIT CC	MGIT INH	MGIT RIF	MGIT SM	MGIT ET
<b>Sensible</b>	+	-	-	-	-
<b>R sólo INH</b>	+	+	-	-	-
<b>R sólo RIF</b>	+	-	+	-	-
<b>R sólo SM</b>	+	-	-	+	-
<b>R sólo ET</b>	+	-	-	-	+
<b>R INH-RIF</b>	+	+	+	-	-

**CC: Control de Crecimiento (inóculo)**

**II. Cepas clínicas:**

**A) Preparación del inóculo a partir de medio sólido:**

- a- Añadir 4 ml de caldo 7H9 a un tubo estéril de 16,5x128mm con tapón y con 8-10 bolitas de cristal.
- b- Recoger con un asa tantas colonias como sean posibles del medio sólido, tratando de no coger restos de medio. Suspender las colonias en el caldo 7H9. La suspensión deberá exceder en turbidez al estándar 1,0 McFarland.
- c- Agitar la suspensión en vortex durante 2-3 minutos para deshacer los grumos más grandes.
- d- Dejar reposar la suspensión durante 20 minutos.
- e- Transferir el sobrenadante a otro tubo, y dejar reposar otros 15 minutos.
- f- Transferir el sobrenadante (deberá ser uniforme, libre de cualquier grumo) a un tercer tubo.
- g- Ajustar la suspensión a un estándar 0,5 McFarland utilizando un nefelómetro (utilizando caldo 7H9).
- h- Diluir 1,0ml de la suspensión 0,5 McFarland en 4ml de solución salina estéril (dilución 1:5). El inóculo está ahora listo. Inocular un tubo Mgit™ con 0.5 ml de esta dilución, al cual se le ha añadido previamente 0.5ml de OADC.
- i- Incubar a 35°C, y cuando el tubo presente fluorescencia durante dos días se utilizará para la determinación de la sensibilidad. Agitar éste tubo en vortex durante 10 segundos, e inocular 1,0ml de la suspensión en 4ml de agua salina estéril (dilución 1:5).
- j- Etiquetar cinco tubos Mgit™ para cada prueba. Etiquetar uno como Mgit™ control, otro como isoniacida, etambutol, rifampicina, y estreptomycin.

- k- Añadir asepticamente 0,5ml de OADC a cada tubo.
- l- Añadir 0,1ml de la solución reconstituida de cada antibiótico en sus respectivos tubos.
- m- Inocular con una pipeta 0,5ml de la suspensión del organismo (1:5), en cada uno de los cinco tubos. Limpiar los tubos con desinfectante. Cerrarlos y mezclar bien.
- n- Incubarlos a 37°C.
- o- Sembrar 0,1ml de la suspensión en una placa de TSA con sangre e incubar a 35-37°C. Inspeccionar la placa a las 48 horas para descartar contaminación bacteriana.

**B) Preparación a partir de un vial Bactec 12B positivo:**

- 1- Desde un vial 12B con un Índice de Crecimiento (GI) alrededor de 999 (mínimo de 500), mezclar bien el cultivo, y aspirar 1.0ml. (Si el vial 12B tiene un GI de 999 durante más de dos días, subcultivar en un nuevo vial 12B, y leer diariamente en el instrumento repitiendo el paso 1.
- 2- Diluir 1.0ml del medio 12B en 4ml de agua salina estéril (dilución 1:5). El inóculo está listo.
- 3- Inocular un tubo Mgit™ con 0.5ml del inóculo, al cual se le ha añadido previamente 0.5ml de OADC. Incubar 37°C.
- 4- Se debe de utilizar un tubo de Mgit™ con fluorescencia positiva de dos días máximo. Agitar éste tubo en el vortex durante 10 segundos.
- 5- Pipetear 1.0ml de suspensión del tubo en 4ml de agua salina estéril (dilución al 1:5). El inóculo está listo.
- 6- Preparar un control positivo y otro negativo.

- 7- Etiquetar 5 tubos Mgit™ para cada aislado, uno como control de crecimiento y los cuatro restantes con las siglas de los tuberculostáticos Mgit™ SM (estreptomomicina), Mgit™ INH (isoniacida), Mgit™ RIF (rifampicina), y por último Mgit™ EMB (etambutol).
- 8- Añadir 0.5ml de Mgit™ OADC a cada tubo.
- 9- Añadir 0.1ml de las soluciones de cada fármaco (previamente reconstituidos con 3ml de agua estéril) a sus respectivos tubos etiquetados. El tubo de control no contiene antibiótico.
- 10- Inocular de cada aislado 0.5ml de la dilución 1:5 en cada uno de los cinco tubos. Limpiar los tubos con desinfectante.
- 11- Incubar a 37°C.

**-Lectura e interpretación de los resultados:**

- Sacar los tubos Mgit™ del incubador el tercer día después de la incubación, y leerlos en una fuente de luz UV.

- Una vez que el tubo de control de crecimiento es positivo, se utiliza para la interpretación de los tubos con antibióticos. Éstos se interpretan el mismo día que el tubo de control se hace positivo, y hasta dos días después.

- Interpretar como sensible si el tubo conteniendo el antibiótico no presenta fluorescencia dentro de los dos días siguientes a la aparición de fluorescencia en el tubo de control de crecimiento, y resistente sí la presenta.

**3.2.5. Determinación de la sensibilidad en medio sólido**

**A) Preparación del inóculo:**

- Con ayuda de una espátula, tomar un número de colonias suficiente que correspondan a aproximadamente 5 mg y transferirlas a un tubo estéril con tapón de rosca que contenga 8-12 perlas de vidrio de unos 4 mm de diámetro en 1ml de agua destilada estéril.

- Agitar 30 minutos en agitador de Kahn. Añadir poco a poco 3 a 4ml de agua destilada estéril. Si la suspensión no es homogénea, dejar decantar y extraer el sobrenadante. Ajustar la capacidad de la suspensión a la de un patrón BCG de 1mg/ml por adición de agua destilada estéril..

- A partir de esta suspensión se realizará en agua destilada estéril las diluciones: 1/1000 y 1/10.000.

#### **B) Determinación de la sensibilidad**

- Los tubos conservados a 2-8°C, se llevan a la temperatura del laboratorio. Sembrar 0,2ml de cada una de las diluciones seleccionadas en los tubos testigos y en los tubos con antibióticos.

- Inundar cuidadosamente la superficie de la pendiente con el inóculo. Los tubos se incuban a 37°C, tumbados sobre la gradilla con el tapón aflojado durante todo el tiempo de la incubación. El inóculo debe cubrir toda la superficie de la pendiente.

#### **Lectura e interpretación de los resultados:**

Se realiza la lectura a los 21 y 28 días de incubación. El nº de colonias se cuenta cuidadosamente, cualquiera que sea su número y tamaño, en los tubos testigos (nº de bacilos viables) y en los tubos con antibiótico (nº de bacilos resistentes en la población inicial). Según el nº de colonias observado, se establece la proporción de bacilos resistentes que existen en la cepa estudiada.

Por debajo de cierta proporción llamada “proporción crítica”, se dice que la cepa es sensible, y por encima de ella se dice que es resistente.

#### **3.2.6. Estudio estadístico y comparación de los tres métodos de antibiograma**

La correlación estadística entre los resultados de la determinación de la sensibilidad de *M. tuberculosis* en los tres sistemas empleados se estableció mediante la prueba de la t de Student para variables impareadas. El nivel de significación estadístico empleado fue del 95% ( $p < 0.05$ ). Así mismo para la evaluación global del sistema Mgit™ se establecieron los valores de sensibilidad, especificidad, fiabilidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) siguiendo los criterios Kodsí y Hagemann<sup>147</sup> y por Laszlo et al.<sup>249</sup>, mediante las fórmulas que se detallan:

Mgit™	BACTEC®460TB Cepas Fármaco Resistente	BACTEC®460TB Cepas Fármaco Sensible
Cepas Resistentes	A	B
Cepas Sensibles	C	D

**Sensibilidad**=  $A/A+C$  ; **Especificidad**=  $D/D+B$  ;

**Fiabilidad**=  $A+D/A+B+C+D$  ; **VPP**=  $A/A+B$  ; **VPN**=  $D/D+C$

### 3.3 Detección de cepas resistentes a rifampicina mediante amplificación-hibridación.

La validación de los resultados obtenidos frente a rifampicina en los diferentes sistemas de antibiograma, se ha llevado a cabo mediante la detección de mutaciones en el gen *rpoB* que codifican las resistencias a dicho antibiótico<sup>189,192</sup>. Se ha utilizado una técnica de amplificación-hibridación comercial<sup>172,175</sup> el INNO LipA Rif TB (Innogenetics-Boehringer-Ingelheim).

#### Principio de la técnica:

Esta técnica se basa en la amplificación del gen *rpoB* de *M.tuberculosis* que codifica la subunidad beta de la ARN-polimerasa. La mayoría de las cepas resistentes a rifampicina presentan mutación en este gen, por lo que tras la amplificación de este gen y la hibridación con sondas de las mutaciones más frecuentes se pueden identificar más del 95% de las cepas de *M.tuberculosis* resistente a rifampicina.

El sistema INNO-LiPA Rif.TB se basa en el principio de hibridación inversa. El material amplificado de ADN es hibridado con sondas de oligonucleótidos específicos e inmovilizado en líneas paralelas sobre tiras de una membrana base. Después de la hibridación, la estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina es añadida y traspasada a otro híbrido previamente formado. La incubación con BCIP/NBT cromogénico da como resultado un precipitado púrpura/marrón.

Para la prueba de la Rif.TB, debe de realizarse la amplificación de una región del gen que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*). Los productos de la amplificación son consecutivamente hibridados utilizando una tira con 10 sondas específicas y un control.

La presencia de *M.tuberculosis* en la muestra es comprobada por la sonda específica de *M.tuberculosis* complex. La ausencia de reactividad del fragmento amplificado con alguna de las sondas S1, S2, S3, S4, y S5 permite una fácil detección de las mutaciones que codifican la resistencia a la rifampicina en *M.tuberculosis*. Además, existen cuatro sondas adicionales específicamente diseñadas para hibridar e identificar las secuencias mutadas de las cuatro mutaciones más frecuentemente observadas: R2(D516V), R4a(H526Y), R4b(H526D), y R5(S531L).

### 3.3.1. Detección de mutaciones en el gen *rpoB* mediante sistema Inno-lipa Rif TB:

- A) **Cepas utilizadas:** Se caracterizaron por este sistema las mutaciones en el gen *rpoB* en las 19 cepas de *M.tuberculosis* resistentes a rifampicina. Así como las cepas control *M.tuberculosis* ATCC 35838 resistente a rifampicina y H37rv sensible a rifampicina.
- B) **Preparación de las muestras:** La preparación de la muestra y la extracción de ADN para amplificación se realizó mediante el procedimiento de Boom et al.(250) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- C) **Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Hibridación y revelado de los amplicones:** 5 $\mu$ l de ésta preparación purificada de ADN se usaron para amplificar en un volumen total de reacción de 50 $\mu$ l, siguiendo el protocolo de amplificación, hibridación y revelado suministrado por el fabricante.
- D) **Interpretación de los resultados:**
  - a) **Control de reactivos:** Es la primera línea que se observa y ha de ser siempre positiva y tener la misma intensidad en cada tira de cada una de las cepas estudiadas.
  - b) **Confirmación de la presencia de ADN de *M.tuberculosis* complex:** Es la segunda línea que se observa y debe también ser siempre positiva.
  - c) **Cepas sensibles:** Se interpreta que una cepa es sensible cuando no se detecta ninguna mutación en el gen estudiado. Este hecho se comprueba por la positividad en las sondas S1-S5 y negatividad en las sondas R.

- d) **Cepas resistentes:** Se interpreta que una cepa es resistente cuando se detecta alguna mutación en el gen estudiado. Este hecho se comprueba cuando se obtiene una señal negativa en alguna de las sondas S1-S5. Además si la mutación es una de las más frecuentes se observará positividad en alguna de las sondas R.



**EVALUACIÓN DEL NUEVO SISTEMA Mgit™ PARA EL AISLAMIENTO DE  
*Mycobacterium tuberculosis* EN MUESTRAS CLÍNICAS Y DETERMINACIÓN DE LA  
SENSIBILIDAD A LOS TUBERCULOSTÁTICOS**

---

---

***4.- RESULTADOS***

La evaluación de un sistema para el diagnóstico microbiológico de las infecciones por *M.tuberculosis*, antes de su incorporación a un laboratorio de micobacteriología clínica supone comprobar que en ese sistema son capaces de crecer la mayoría de las cepas de micobacterias con interés clínico así como estimar el tiempo medio de detección. Así mismo hay que estudiar la adaptabilidad del nuevo método a la sistemática de rutina del laboratorio valorando la eficacia del sistema de decontaminación que emplea, al mismo tiempo que su adaptabilidad a los sistemas de identificación utilizados. Finalmente, esta evaluación ha de incluir el estudio comparativo de los resultados de las pruebas de determinación de la sensibilidad a los tuberculostáticos obtenidos por el nuevo sistema y el utilizado rutinariamente en el laboratorio.

#### 4.1. Evaluación preliminar del sistema de cultivo Mgit™.

En la evaluación preliminar del sistema Mgit™ de los métodos de decontaminación utilizados y de su capacidad de permitir el crecimiento de la mayoría de especies de micobacterias de interés clínico se emplearon diversas cepas de control procedentes de colecciones internacionales como de colecciones de aislamientos clínicos del Departamento de Microbiología.

La eficacia de la técnica de decontaminación con N-acetil-cisteína en el sistema Mgit™ se determinó con la utilización de: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 empleando dos inóculos diferentes 1/5 y 1/100. Estas cepas fueron sometidas al proceso de decontaminación con N-acetil-cisteína-hidróxido sódico, en cinco ocasiones distintas comprobándose que en ninguna de ellas se detectó crecimiento en los tubos Mgit™ inoculados. No se hicieron más determinaciones ya que dicho sistema de decontaminación está ampliamente evaluado y se utiliza de rutina en muchos laboratorios desde hace muchos años.

La eficacia del sistema Mgit™ como método de aislamiento de micobacterias se llevó a cabo utilizando dos inóculos 1/5 y 1/100 de las siguientes cepas:

##### 1.-Cepas patrón

-*M.tuberculosis* ATCC 27294.

-*M.kansasii* ATCC 12478.

-*M.fortuitum* ATCC 6841.

## 2.-Cepas clínicas

- Dos cepas de *M. avium*.
- Dos cepas de *M. intracellulare*.
- Dos cepas de *M. fortuitum*.
- Una cepa de *M. scrofulaceum*.

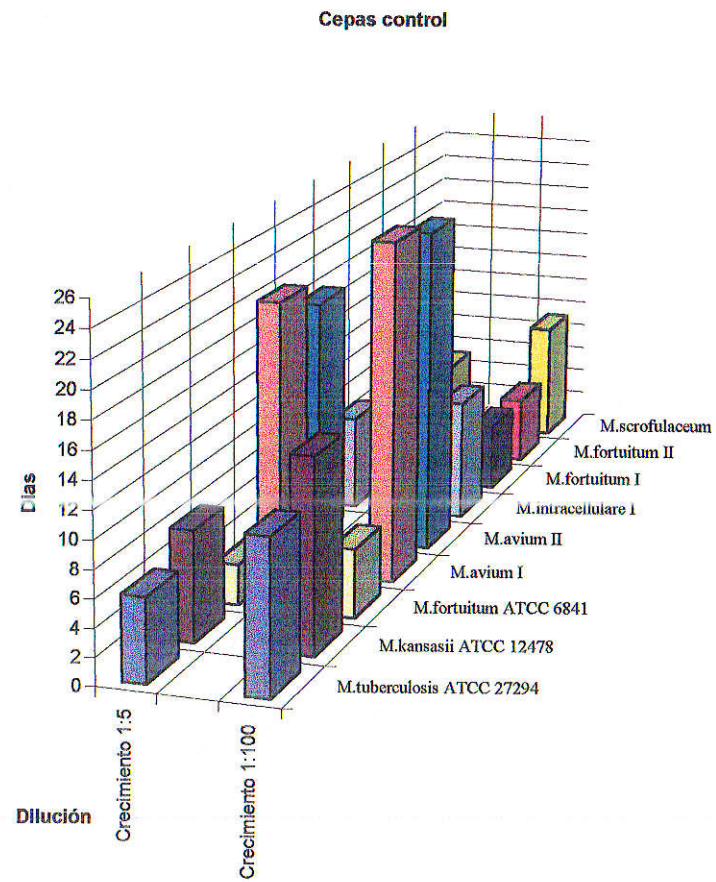
Todas las cepas de las distintas especies de micobacterias crecieron en el sistema Mgit™, siendo lógicamente los tiempos medios de detección más cortos cuando se utilizó el inóculo más alto. Como era de esperar estos tiempos de crecimiento fueron variables dependiendo de la especie de micobacteria estudiada, y variaron de los 2 días para *M. fortuitum* a 20-25 días para *M. avium* (Tabla y Figura 4.1).

En el estudio de la aplicabilidad del sistema de identificación mediante hibridación por sonda de Gen Probe™ se utilizaron las cepas clínicas de *M. tuberculosis*, *M. avium* y *M. kansasii*. Tras preparar una suspensión de cada cepa equivalente al 0.5 de MacFarland, se inoculó en un tubo Mgit™ suplementado con 0.5ml de OADC y se incubó a 35°C. Se procedió a la lectura diaria en el transiluminador, y una vez detectada la fluorescencia se mantenía la incubación 24 horas adicionales, ya que al ser un sistema tan sensible que no suele haber demasiados bacilos el primer día positividad. Transcurrido dicho tiempo se realizó la hibridación tal como se especifica por el fabricante, es decir, se tomaron 100 ul de cada tubo con fluorescencia positiva en tubos con tapón de rosca de 10 ml, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante, y a partir del sedimento se realizó la técnica habitual de identificación por sonda de ADN. En todas las cepas evaluadas la detección se realizó correctamente.

Tabla 4.1 Media en días de crecimiento de las cepas control.

CEPAS	CRECIMIENTO 1:5	CRECIMIENTO 1:100
<i>M.tuberculosis</i> ATCC 27294	6 días	11 días
<i>M.kansasii</i> ATCC 12478	8 días	14 días
<i>M.fortuitum</i> ATCC 6841	3 días	5 días
<i>M.avium</i> I	20 días	25 días
<i>M.avium</i> II	18 días	24 días
<i>M.intracellulare</i> I	7 días	9 días
<i>M.intracellulare</i> II	8 días	10 días
<i>M.fortuitum</i> I	2 días	5 días
<i>M.fortuitum</i> II	2 días	5 días
<i>M.scrofulaceum</i>	5 días	9 días

Figura 4.1 Media en días de crecimiento de las cepas control



#### **4.2. Evaluación del sistema Mgit™ para aislamiento de Mycobacterium tuberculosis en muestras clínicas.**

La evaluación del sistema Mgit™ se realizó de forma comparativa con los dos sistemas de aislamiento de micobacterias que se vienen utilizando desde hace más de 10 años en la Sección de Micobacterias del H.U.V. Macarena.

##### **4.2.1. Evaluación de la sensibilidad de los sistemas**

Se realizó una evaluación prospectiva del sistema Mgit™ durante el período de Octubre a Diciembre de 1995. En ese período se procesaron un total de 1071 muestras clínicas en la sección de micobacterias del H.U.V. Macarena, siendo seleccionadas un total de 310 para la realización del estudio. El criterio de selección de las mismas se hizo en base a la alta sospecha de la presencia de *M.tuberculosis* en dichas muestras. Doscientas cuarenta (77,42%) de ellas eran de origen respiratorio, y las setenta restante (22,58%) de distinta procedencia clínica como se refleja en la (Tabla y Figura 4.2.)

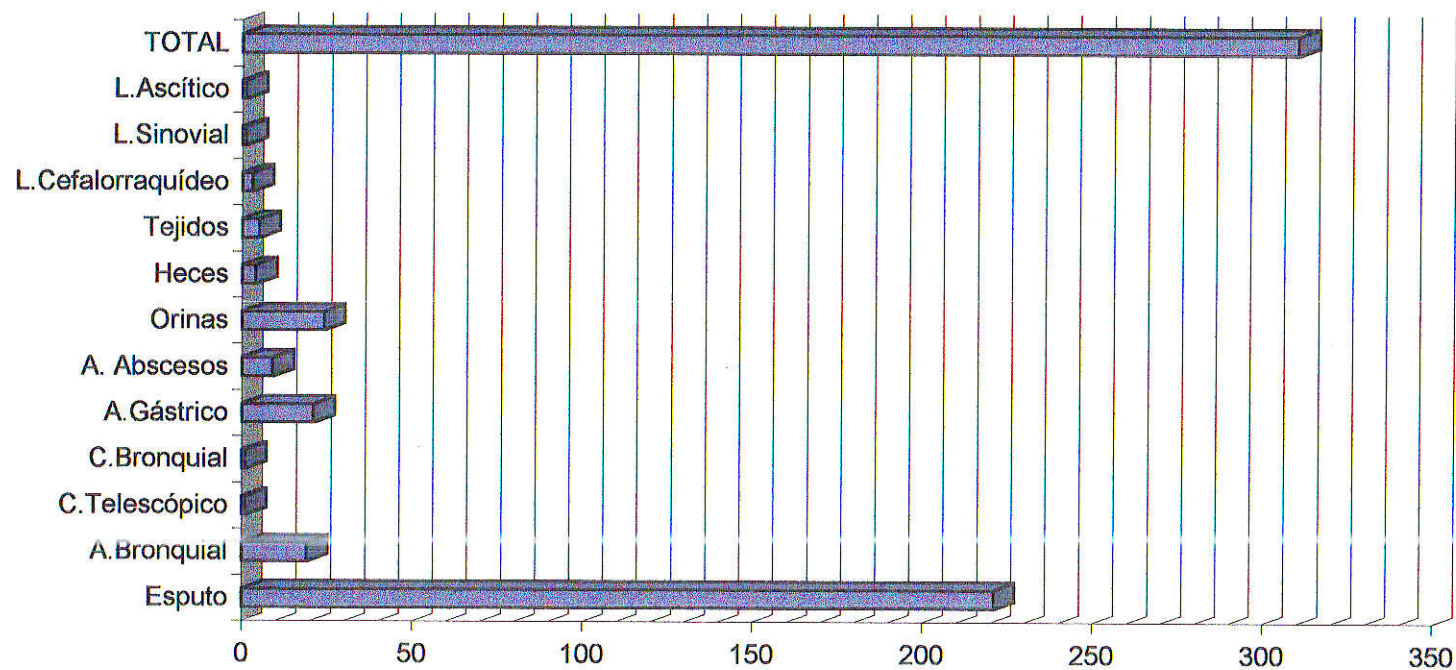
Durante el período objeto de estudio, se inocularon las 310 muestras detalladas anteriormente en el sistema Bactec®460TB, en el sistema Mgit™ y en el medio sólido Löwestein-Jensen con piruvato. Combinando los resultados obtenidos con los tres sistemas y tras la identificación mediante tinción de Ziehl-Neelsen e hibridación con sonda se aislaron un total de 48(15,48%) cepas de *M.tuberculosis*. Inicialmente tanto en el sistema Bactec®460TB como en el sistema Mgit™ se detectaron igual número de muestras positivas ascendiendo a 48 muestras (15,48%) en cada uno de los sistemas. Tras la tinción de Ziehl-Neelsen, la positividad en 5 de las muestras de ambos sistemas se demostró que era debida a contaminación bacteriana, por lo que el número de cepas aisladas en cada sistema se redujo a 43 (89,5%) mientras que en el medio de Löwestein-Jensen se aislaron 40 cepas (83,33%) y tres muestras se descartaron por contaminación (Tabla y Figura 4.3 ).

La rentabilidad diagnóstica obtenida con los dos sistemas que utilizan medios líquidos, analizada globalmente, es similar con una sensibilidad del 89,5% y una tasa de contaminación del 1,61%. A pesar de la coincidencia numérica de los valores, hemos de hacer constar que no todas las muestras positivas en el sistema Mgit™ lo fueron en el sistema Bactec®460TB y viceversa .

**Tabla 4.2      Distribución de las Muestras Clínicas en Función de su Procedencia**

<u>Muestras</u>	<u>Número</u>	<u>Muestras</u>	<u>Número</u>
- Esputos	221	- Heces	4
- Aspirado bronquial	19	- Tejidos	5
- Cateter Telescópico	1	- Líquido Cefalorraquídeo	3
- Cepillo Bronquial	1	- Líquido Sinovial	1
- A. Gástrico	21	- Líquido Ascítico	1
- Aspirado Abcesos	9	-----	
- Orinas	24	<b>TOTAL</b>	<b>310</b>

Figura 4.2 Distribución de las Muestras Clínicas en Función de su Procedencia

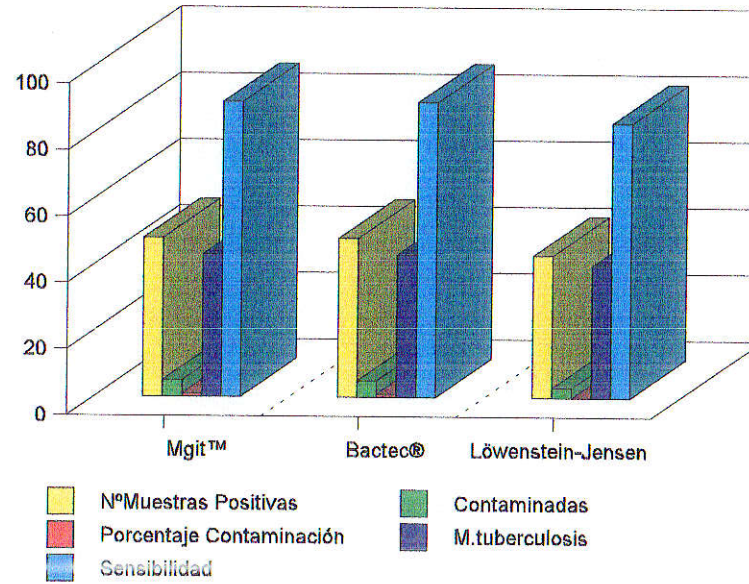




**Tabla 4.3 Comparación de los tres sistemas de cultivo evaluados sobre un total de 310 muestras clínicas.**

	<b>Mgit™</b>	<b>Bactec®460TB</b>	<b>Löwenstein-Jensen</b>
<b>NºMuestras Positivas</b>	<b>48</b>	<b>48</b>	<b>43</b>
<b>Contaminadas</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>3</b>
<b>Porcentaje Contaminación</b>	<b>1.61%</b>	<b>1.61%</b>	<b>0.96%</b>
<b><i>M.tuberculosis</i></b>	<b>43</b>	<b>43</b>	<b>40</b>
<b>Sensibilidad</b>	<b>89.5%</b>	<b>89.5%</b>	<b>83.33%</b>

Figura: 4.3 Comparación de los tres sistemas de cultivo evaluados sobre un total de 310 muestras clínicas.



Es importante destacar, como es conocido, que ninguno de los tres sistemas empleados ha detectado el 100% de los aislamientos de *M.tuberculosis*. Treinta y seis cepas (75%) fueron detectadas por los tres sistemas, dos cepas (4,16%) lo fueron exclusivamente por el sistema Mgit™, dos cepas (4,16%) por el sistema Bactec®460TB y otras dos cepas (4,16%) sólo por el medio Löwestein-Jensen. Una cepa se aisló en la combinación Bactec®460TB /Löwestein –Jensen, cuatro en Bactec®460TB/Mgit™, y una en Mgit™/Löwestein Jensen (Tabla y Figura 4.4).

La sensibilidad de los diferentes sistemas de aislamiento se ve aumentada considerablemente si tenemos en cuenta los valores de recuperación que presentan dichos sistemas combinados dos a dos (Tabla 4.4). La mayor sensibilidad (95,8% ) la encontramos con las combinaciones Bactec®460TB/Mgit™ y Bactec®460TB/Löwestein-Jensen, siendo ligeramente inferior (93,75%) con la combinación Mgit™/Löwestein-Jensen.

A la luz de estos resultados se confirma la necesidad de utilizar la combinación de dos sistemas de cultivo para alcanzar la máxima sensibilidad en el aislamiento de *M.tuberculosis* en muestras clínicas. La utilización de un medio líquido y un medio sólido es el considerado "gold standard", y aunque la combinación Mgit™/Löwestein-Jensen es ligeramente inferior a Bactec®460TB/Löwestein-Jensen puede ser una alternativa válida ya que evita el gran problema de los residuos radiactivos y la necesidad de una instalación radiactiva de 3ª categoría.

#### 4.2.2. Evaluación de los tiempos de detección.

Una vez realizado el estudio comparativo de la rentabilidad diagnóstica de los tres sistemas de aislamiento, el segundo parámetro a analizar era el tiempo medio de detección en cada uno de ellos y comprobar si alguno se mostraba superior en este aspecto con respecto a los demás.

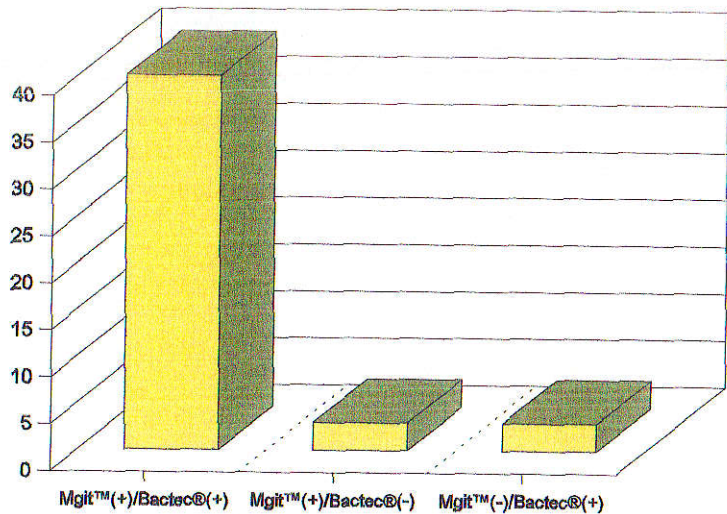
La lectura de los resultados se realizó según el cronograma siguiente:

1.- Sistema Bactec®460TB: Lectura tres veces (lunes, miércoles y viernes) durante la primera y segunda semana, seguida de una lectura semanal (jueves) durante la tercera, cuarta y quinta semana de incubación.

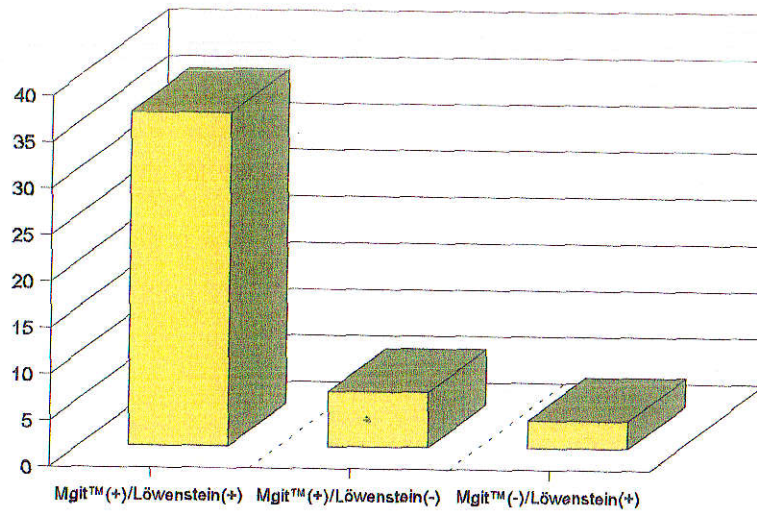
**Tabla 4.4 Estudio comparativo de la rentabilidad diagnóstica de los tres sistemas de cultivo sobre el total de 48 muestras positivas.**

<b>Sensibilidad</b>	<b>Mgit™(+)/Bactec®460TB(+)</b>	<b>Mgit™(+)/Bactec®460TB(-)</b>	<b>Mgit™(-)/Bactec®460TB(+)</b>
<b>95.8%</b>	<b>40</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>Sensibilidad</b>	<b>Mgit™(+)/Löwenstein(+)</b>	<b>Mgit™(+)/Löwenstein(-)</b>	<b>Mgit™(-)/Löwenstein(+)</b>
<b>93.75%</b>	<b>36</b>	<b>6</b>	<b>3</b>
<b>Sensibilidad</b>	<b>Bactec®460TB(+)/Löwenstein(+)</b>	<b>Bactec®460TB(+)/Löwenstein(-)</b>	<b>Bactec®460TB(-)/Löwenstein(+)</b>
<b>95.8%</b>	<b>37</b>	<b>6</b>	<b>3</b>

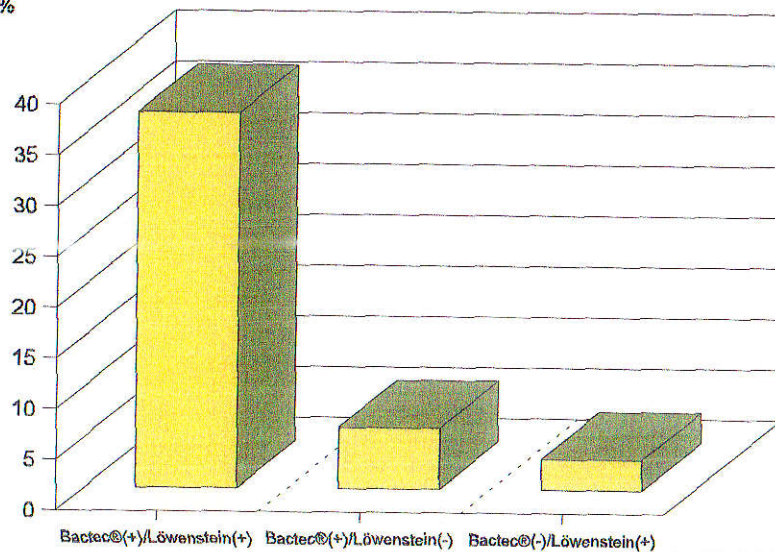
**Figura 4.4. Estudio comparativo de la rentabilidad diagnóstica de los tres sistemas de cultivo sobre el total de 48 muestras positivas.**



95.8%



93.75%



95.8%

2.- Sistema Mgit™: Lectura diaria a excepción de los fines de semana

3.- Medio Löwestein-Jensen: Lectura semanal (martes) durante 8 semanas.

Los tiempos medios de detección en los sistemas que emplean medios líquidos Bactec®460TB y Mgit™ son muy similares entre siendo 14 y 13,5 días respectivamente con rangos de 3-30 y 4-22 días, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa en estos valores ( $p=0.72$ ). En cambio sí encontramos diferencias estadísticas apreciables al comparar los tiempos de detección del sistema Bactec®460TB con el aislamiento en Löwestein-Jensen ( $p<10^{-6}$ ) al igual que con el sistema Mgit™ y Löwestein-Jensen ( $p<10^{-6}$ ). (Tabla y Figura 4.5).

Este hecho se confirma independientemente del resultado de la baciloscopia directa de la muestra. Lógicamente, todos los tiempos de detección se acortan en las muestras baciloscopias positivas en comparación con las muestras baciloscopia negativa (Tablas y Figura 4.6 y 4.7). En el grupo primero, la mediana y rango en días fueron 8 (3-20) días en el sistema Mgit™, estos valores fueron ligeramente superiores 10 (4-19) días en el sistema Bactec®460TB y aún más 18 (10-30) días en el medio Löwestein-Jensen. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos sistemas que emplean medios líquidos aunque en ambos es tiempo de detección en este grupo de muestras es significativamente inferior al aislamiento en medio sólido. En el grupo segundo, las muestras baciloscopia negativa, se repiten los mismos hallazgos aunque con valores en los tiempos de detección más altos.

El sistema donde la detección del crecimiento de *M.tuberculosis* fue más precoz, ya sea considerando el total de las muestras positivas (13,5 días), las muestras baciloscopia positiva (8 días) y las muestras baciloscopia negativas (15 días) fué en el nuevo sistema Mgit™, aunque sin diferencias significativas sobre el sistema tradicional Bactec®460TB.

El análisis de los resultados obtenidos en los parámetros evaluados de sensibilidad en el aislamiento de *M.tuberculosis* a partir de muestras clínicas y el tiempo necesario para detectar su crecimiento en los tres sistemas evaluados, nos permite concluir que el rendimiento global del sistema Mgit™ es similar al sistema Bactec®460TB y estos dos sistemas son superiores al aislamiento en medio sólido, aunque ninguno de ellos es capaz de detectar el 100% de las muestras positivas siendo necesario combinar dos de ellos. La

**Tabla 4.5** Tiempo medio de detección de crecimiento de *M.tuberculosis* en los diferentes Sistemas de cultivo utilizados.

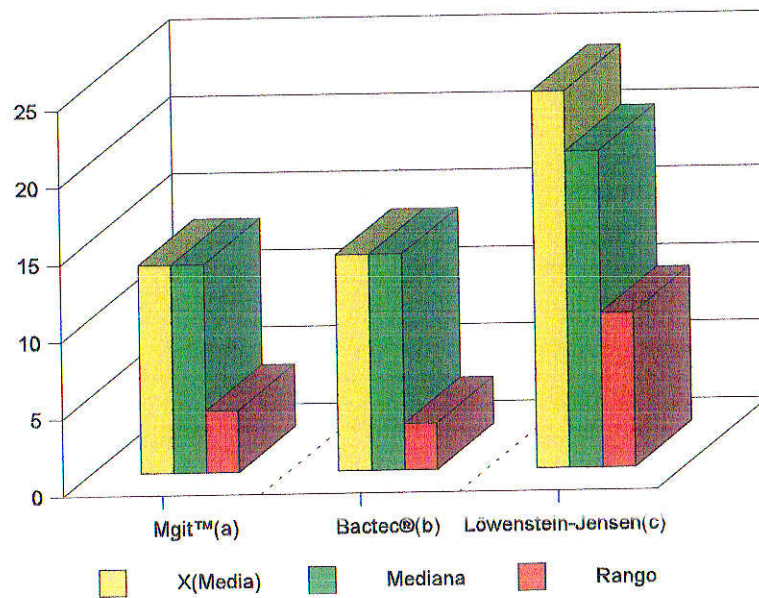
<b>Tiempo detección</b>	<b>Mgit™(a)</b>	<b>Bactec®460TB(b)</b>	<b>Löwenstein-Jensen(c)</b>
<b>X(Media)</b>	<b>13,5 ± 6,7</b>	<b>14.1 ± 6,2</b>	<b>24,4 ± 8,5</b>
<b>Mediana</b>	<b>13,5</b>	<b>14</b>	<b>20,5</b>
<b>Rango</b>	<b>4-22</b>	<b>3-30</b>	<b>10-40</b>

**ab: p = 0.72**

**ac: p < 10<sup>-6</sup>**

**bc: p < 10<sup>-6</sup>**

Figura 4.5 Tiempo medio de detección de crecimiento de *M.tuberculosis* en los diferentes Sistemas de cultivo utilizados.



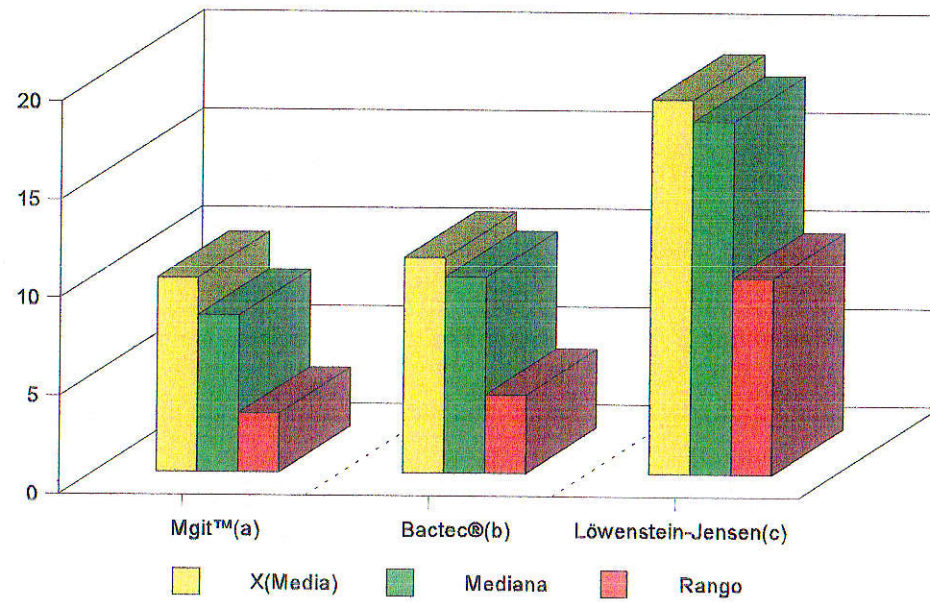


**Tabla 4.6 Tiempos Medios de Detección en las muestras Baciloscopias Positivas por Sistemas**

<b>Tiempo detección</b>	<b>Mgit™(a)</b>	<b>Bactec®460TB(b)</b>	<b>Löwenstein-Jensen(c)</b>
<b>X(Media)</b>	<b>9,91 ± 7,2</b>	<b>11 ± 4,8</b>	<b>19,1 ± 5,5</b>
<b>Mediana</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>18</b>
<b>Rango</b>	<b>3-20</b>	<b>4-19</b>	<b>10-30</b>

ab:  $p = 0,66$  NS  
 ac:  $p = 3,1 \times 10^{-4}$   
 bc:  $p = 9,3 \times 10^{-3}$

**Figura 4.6** Tiempos Medios de Detección en las muestras Baciloscopias Positivas por Sistemas



**Tabla 4.7 Tiempos Medios de Detección en las muestras Baciloscopias Negativas por Sistemas.**

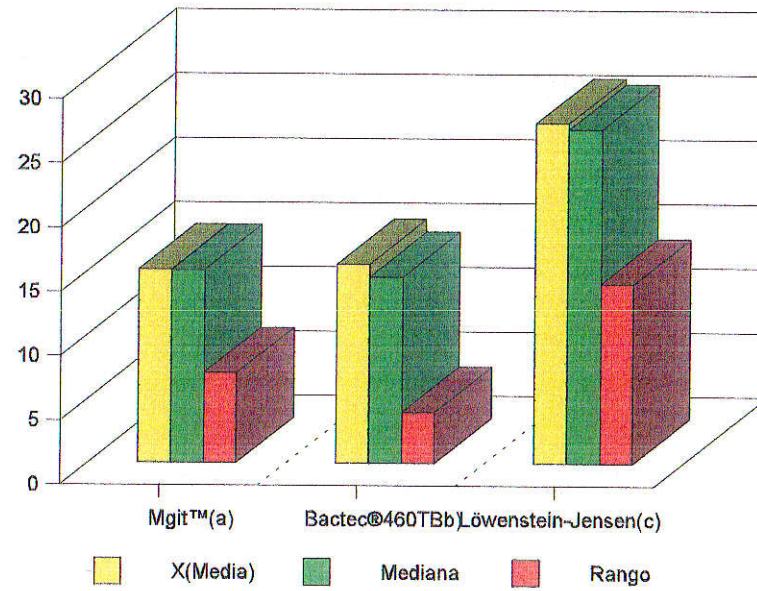
<b>Tiempo detección</b>	<b>Mgit™(a)</b>	<b>Bactec®460TBb)</b>	<b>Löwenstein-Jensen(c)</b>
<b>X(Media)</b>	<b>15,04 ± 5,99</b>	<b>15,5 ± 6,2</b>	<b>26,5 ± 8,79</b>
<b>Mediana</b>	<b>15</b>	<b>14,5</b>	<b>26</b>
<b>Rango</b>	<b>7-30</b>	<b>4-22</b>	<b>14-42</b>

**ab:  $p = 0.78$**

**ac:  $p < 10^{-6}$**

**bc:  $p = 2 \times 10^{-6}$**

**Figura 4.7** Tiempos Medios de Detección en las muestras Baciloscopias Negativas por Sistemas.



estrategia más adecuada sería la combinación del aislamiento en medio sólido Löwestein-Jensen y el sistema Mgit™, ya que este último sistema tiene un rendimiento similar al tradicional Bactec®460TB, pero evitaría los inconvenientes de este último como son la necesidad de una instalación radiactiva de 3ª categoría con los requisitos legales de la presencia de un supervisor de instalación radiactiva, manipuladores de isótopos radiactivos, las revisiones médicas periódicas del personal de dicha instalación y la eliminación de residuos radiactivos.

#### **4.3. Evaluación del sistema Mgit™ para la determinación de la sensibilidad a los tuberculostáticos.**

##### **4.3.1. Determinación de la sensibilidad en el Sistema Mgit™.**

Se han evaluado inicialmente dos sistemas para la determinación de la sensibilidad de *M.tuberculosis* a los cuatro tuberculostáticos principales: Estreptomicina (SM), Isoniacida (INH), Rifampicina (RIF) y Etambutol (ET), el nuevo sistema Mgit™ y el sistema radiométrico Bactec®460TB en tres grupos de cepas.

**Grupo I:** Cinco cepas de colecciones internacionales con resistencia conocida a los distintos tuberculostáticos como control de calidad de las determinaciones.

- *M.tuberculosis* H37rv, sensible a todos los tuberculostáticos
- *M.tuberculosis* ATCC 35838, resistente a rifampicina
- *M.tuberculosis* ATCC 35822, resistente a isoniacida
- *M.tuberculosis* ATCC 35820, resistente a estreptomicina
- *M.tuberculosis* ATCC 35837, resistente a etambutol

**Grupo II:** 24 cepas de *M.tuberculosis*, aisladas durante los años 1993, 1994 y 1995 de muestras clínicas procedentes de diferentes pacientes con la característica de presentar resistencia a uno ó más de los tuberculostáticos probados.

**Grupo III:** 28 cepas de *M.tuberculosis* aisladas en los primeros meses del año 1996 cuyos patrones de resistencia eran desconocidos, en las que se realizó un estudio prospectivo.

Los patrones de sensibilidad obtenidos por el sistema Mgit™ del primer grupo de cepas (control de calidad), así como los tiempos de crecimiento del control sin antimicrobiano y con el antimicrobiano de cada una de las cepas se recogen en la Tabla y Figura 4.8. Las dos cepas control de *M.tuberculosis* sensibles a todos los antimicrobianos crecieron a los 7 días únicamente en el tubo control de crecimiento. Como se puede comprobar el tiempo de crecimiento en las cepas resistentes fué el mismo en el control y en el tubo con el antimicrobiano.

La determinación de los patrones de sensibilidad a los dos restantes grupos, se realizó simultáneamente en los dos sistemas evaluados Mgit™ y Bactec®460TB. A la vista de los resultados obtenidos que se expresarán a continuación, nos vimos obligados a llevar a cabo tres determinaciones de la sensibilidad de estas 52 cepas.

En las Tablas 4.9 y 4.10 se recogen los resultados obtenidos en la primera determinación en los dos sistemas evaluados. En 18 (35%) cepas existe los resultados son discrepantes mientras que en las 34 (65%) cepas restantes existe coincidencia en los resultados obtenidos en los dos sistemas. Estas discrepancias se encontraron en 12 cepas clasificadas como resistentes en el sistema Mgit™, 5 a SM, 2 a INH, 1 a RIF y 4 a ET, mientras que en el sistema Bactec®460TB son consideradas sensibles. Así mismo encontramos 6 cepas clasificadas como sensibles en el sistema Mgit™, 3 cepas a SM y 3 cepas a RIF, pero resistentes en el sistema Bactec®460TB (Tabla y Figura 4.10).

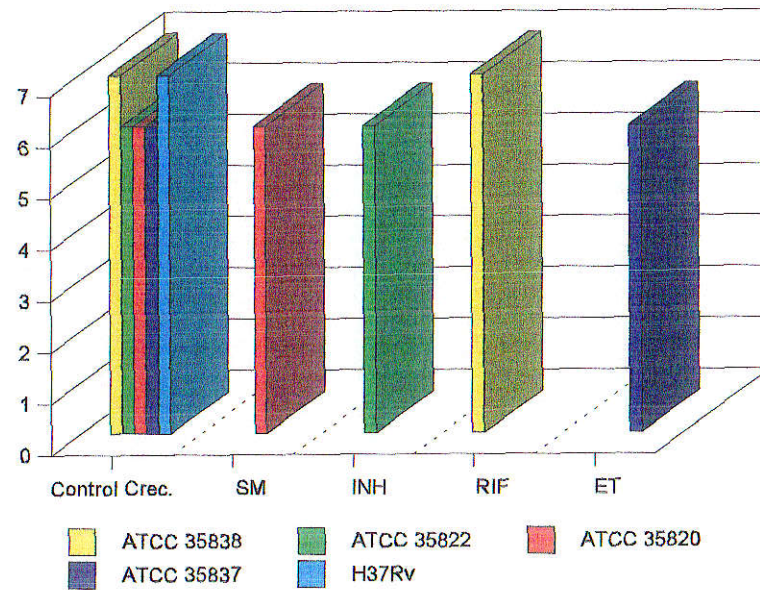
Analizando individualmente los resultados obtenidos para cada tuberculostático la concordancia de los mismos en los dos sistemas fué del 90,4% para SM, INH y ET, y del 92,3% para RIF (Tabla y Figura 4.10). Los valores estimados de sensibilidad, especificidad, fiabilidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los resultados obtenidos en el sistema Mgit™ al compararlos con el método de referencia (sistema Bactec®460TB) se recogen en la Tabla y Figura 4.11.

El alto nivel de discrepancias entre ambos sistemas, nos hizo plantearnos una repetición de la determinación de la sensibilidad en las cepas discrepantes por ambos sistemas para comprobar si estas discrepancias eran reales o debidas a una mala realización o interpretación de los resultados en nuevo sistema Mgit™ del que carecíamos de experiencia.

**Tabla 4.8 Tiempo Medio de Crecimiento de las Cepas Control en el Sistema Mgit™**

<b>Cepa</b>	<b>Control Crec.</b>	<b>SM</b>	<b>INH</b>	<b>RIF</b>	<b>ET</b>
<b>ATCC 35838</b>	<b>7</b>			<b>7</b>	
<b>ATCC 35822</b>	<b>6</b>		<b>6</b>		
<b>ATCC 35820</b>	<b>6</b>	<b>6</b>			
<b>ATCC 35837</b>	<b>6</b>				<b>6</b>
<b>H37Rv</b>	<b>7</b>				

**Figura 4.8** Tiempo Medio de Crecimiento de las Cepas Control en el Sistema Mgit™

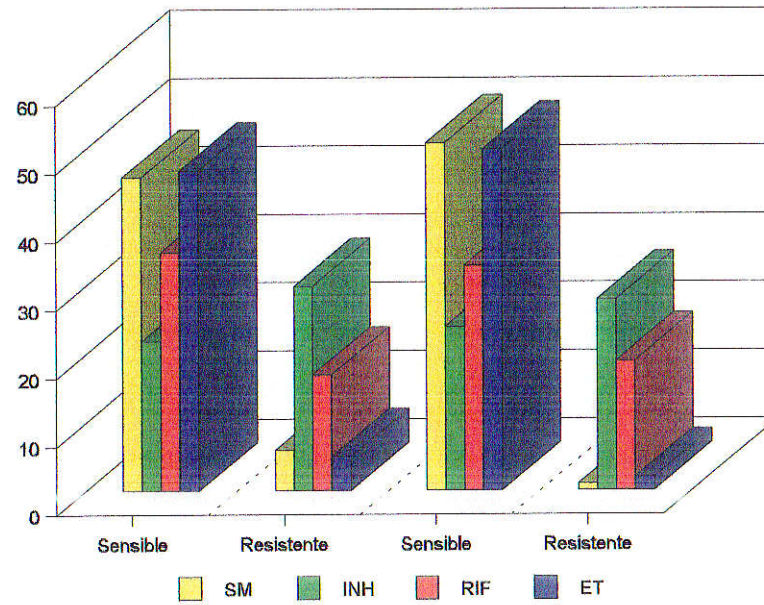




**Tabla 4.9 Resultados de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de *M.tuberculosis* en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bacter@460TB. Primera Determinación**

FÁRMACO	Mgit™		Bacter@460TB.	
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
SM	46	6	51	1
INH	22	30	24	28
RIF	35	17	33	19
ET	47	5	50	2

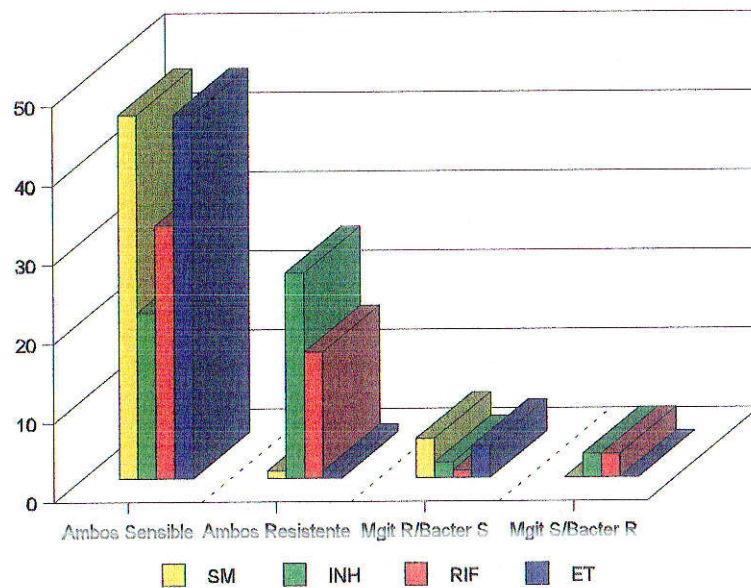
**Figura 4.9** Resultados de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de *M.tuberculosis* en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bacter@460TB. Primera Determinación



**Tabla 4.10 Comparación de los resultados obtenidos de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de *M.tuberculosis* en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bacter®460TB. Primera Determinación.**

FÁRMACO	Mgit™ Versus Bacter®460TB.				
	Ambos Sensible	Ambos Resistente	Mgit R/Bacter S	Mgit S/Bacter R	Concordancia
SM	46	1	5	0	90,6%
INH	21	26	2	3	90,6%
RIF	32	16	1	3	92,3%
ET	46	1	4	0	90,4%

**Figura 4.10** Comparación de los resultados obtenidos de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de *M.tuberculosis* en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bactec®460TB. Primera Determinación.



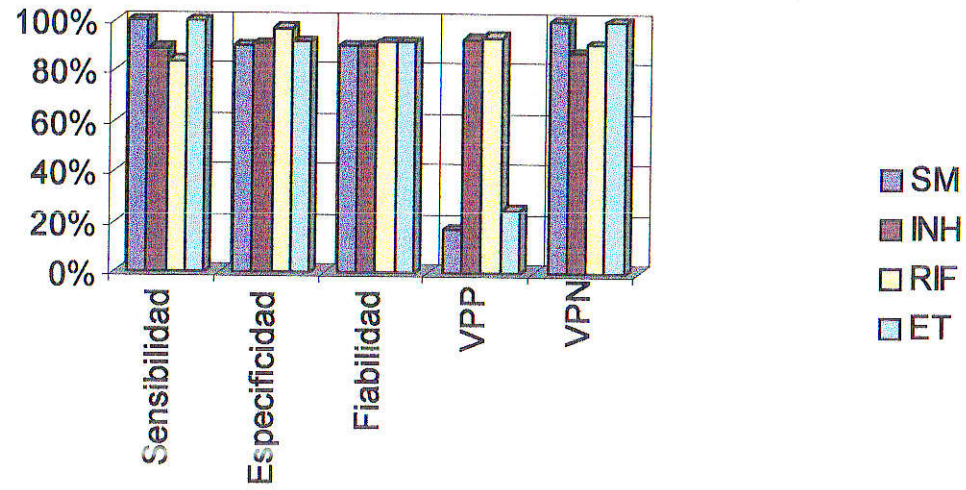
**Tabla 4.11 Evaluación global del sistema Mgit™ en la determinación de la Sensibilidad a los tuberculostáticos de las 52 Cepas. 1ª Dterminación**

FÁRMACO	Mgit™ Versus Bactec®				
	Sensibilidad	Especificidad	Fiabilidad	VPP	VPN
SM	100%	90.2%	90.4%	17%	100 %
INH	89%	91 %	90 %	93%	87.5%
RIF	84%	97 %	92 %	94%	91 %
ET	100%	92 %	92 %	25%	100 %

VPP = Valor Predictivo Positivo

VPN = Valor Predictivo Negativo

**Figura 4.11** Evaluación global del sistema Mgit™ en la determinación de la Sensibilidad a los tuberculostáticos de las 52 Cepas. 1ª Determinación.



Repetido el experimento, comprobamos que algunas de las discrepancias desaparecieron pero otras se seguían manteniendo (Tablas y Figuras 4.12, 4.13 y 4.14). Las 12 cepas clasificadas como resistentes en el sistema Mgit™ pero sensibles en el sistema Bactec®460TB se redujeron a 6, cinco a SM y una a INH son consideradas sensibles. Por el contrario, las discrepancias se mantenían con las 6 cepas clasificadas como sensibles en el sistema Mgit™, 3 cepas a SM y 3 cepas a RIF, pero resistentes en el sistema Bactec®460TB (Tabla y Figura 4.13). En esta segunda determinación la concordancia de los resultados frente a SM no varió y aumentó para INH al 92,3%, para RIF al 94,2% y fué total (100%) para ET, lo que supuso una mejora en los parámetros de evaluación del nuevo sistema (Tabla y Figura 4.14). Los valores estimados de sensibilidad, especificidad, fiabilidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los resultados obtenidos en el sistema Mgit™ al compararlos con el método de referencia (sistema Bactec®460TB) se recogen en la Tabla y Figura 4.11.

Al comprobar que las discrepancias en los resultados de la sensibilidad de algunas cepas de *M.tuberculosis* a SM y RIF se mantenían, procedimos a analizar las posibles diferencias existentes en los protocolos de determinación de sensibilidad en ambos sistemas. La única diferencia significativa era que las concentraciones críticas de SM y RIF utilizadas eran distintas, así en el sistema Mgit™ eran de 0,8 µg/ml para SM y 1 µg/ml para RIF mientras que en el sistema Bactec®460TB eran de 2 µg/ml para cada uno de los fármacos. Por tanto las concentraciones críticas de estos dos antibióticos en el sistema Bactec®460TB eran el doble de las utilizadas en el sistema Mgit™. A la vista de estos hechos, se realizó una tercera determinación la sensibilidad de las cepas discrepantes utilizando las concentraciones críticas del sistema Bactec®460TB pero aplicadas también al sistema Mgit™. Aunque las concentraciones críticas de INH son idénticas en ambos sistemas repetimos la determinación de sensibilidad a este fármaco de las cepas discrepantes.

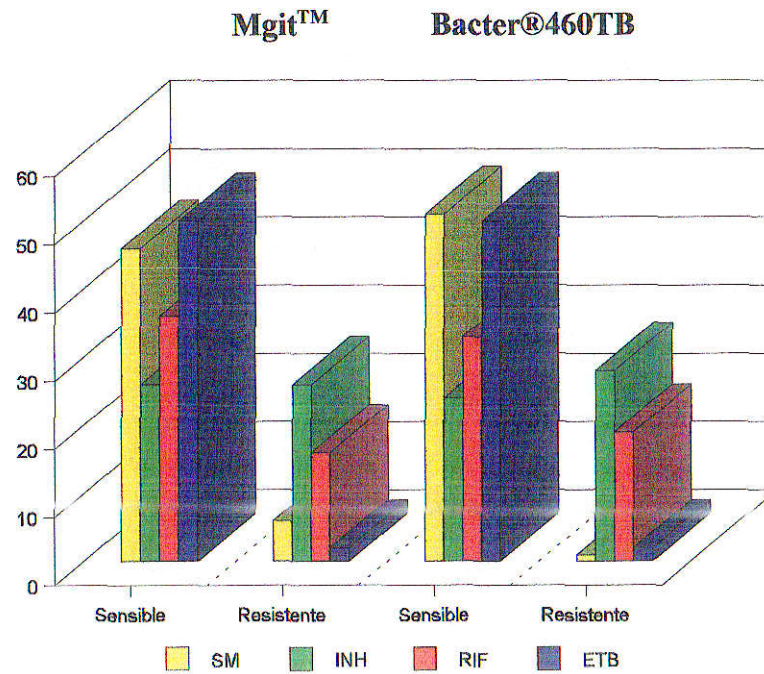
Los resultados obtenidos en esta determinación se encuentran recogidos en las Tablas y Figuras 4.15 y 4.16. Como se puede comprobar la concordancia de los resultados a SM en los dos sistemas con las mismas concentraciones críticas fue total del 100%, aunque se mantenían las discrepancias para RIF e INH. La concordancia a INH ascendió ligeramente (94,2%) ya que una cepa clasificada como resistente en el sistema Mgit™ cambió a sensible, probablemente por un problema de inóculo en la segunda

**Tabla 4.12 Resultados de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de *M.tuberculosis* en los dos Sistemas de Evaluación Mgit™ y Bacter®460TB. 2ªDeterminación.**

FÁRMACO	Mgit™		Bacter®460TB.	
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
SM	46	6	51	1
INH	26	26	24	28
RIF	36	16	33	19
ETB	50	2	50	2



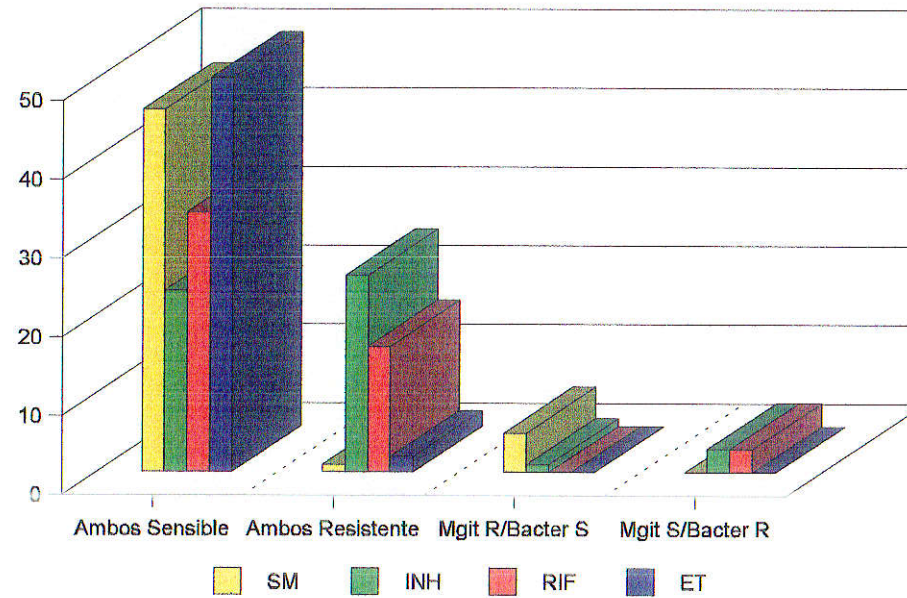
**Figura 4.12** Resultados de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de *M.tuberculosis* en los dos Sistemas de Evaluación Mgit™ y Bacter@460TB. 2ªDeterminación.



**Tabla 4.13 Comparación de los resultados obtenidos de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de *M. tuberculosis* en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bacter®460TB. Segunda Determinación.**

FÁRMACO	Mgit™ Versus Bacter®460TB.				Concordancia
	Ambos Sensible	Ambos Resistente	Mgit R/Bacter S	Mgit S/Bacter R	
SM	46	1	5	0	90,4%
INH	23	25	1	3	92,3%
RIF	33	16	0	3	94,2%
ET	50	2	0	0	100%

**Figura 4.13** Comparación de los resultados obtenidos de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de *M. tuberculosis* en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bactec®460TB. Segunda Determinación

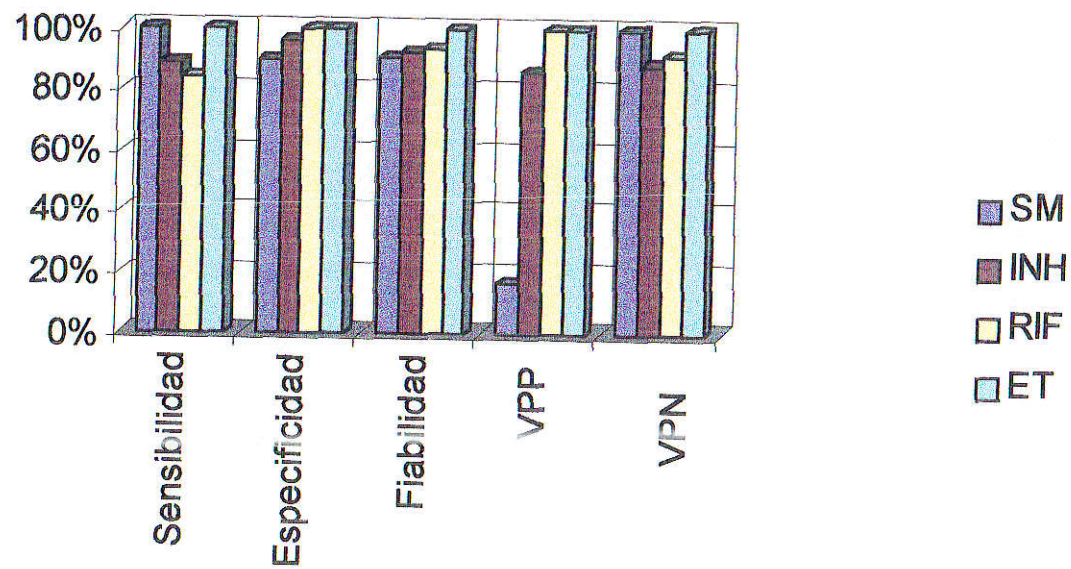


**Tabla 4.14. Evaluación global del sistema Mgit™ en la determinación de la Sensibilidad, a los tuberculostáticos de las 52 Cepas. Segunda Determinación.**

	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Fiabilidad</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>
<b>SM</b>	<b>100%</b>	<b>90.2%</b>	<b>90.4 %</b>	<b>17 %</b>	<b>100 %</b>
<b>INH</b>	<b>89%</b>	<b>96 %</b>	<b>92.30%</b>	<b>86.20%</b>	<b>88.46%</b>
<b>RIF</b>	<b>84%</b>	<b>100 %</b>	<b>94 %</b>	<b>100 %</b>	<b>91.6 %</b>
<b>ET</b>	<b>100%</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>

VPP = Valor Predictivo Positivo  
 VPN = Valor Predictivo Negativo

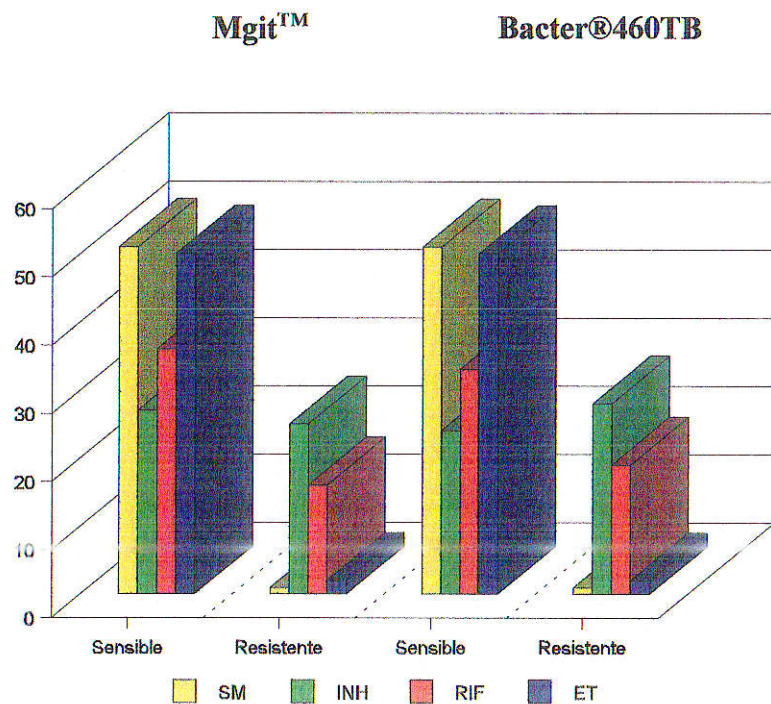
Figura 4.14 Evaluación global del sistema Mgit™ en la determinación de la Sensibilidad, a los Tuberculostáticos de las 52 Cepas. Segunda Determinación



**Tabla 4.15 Resultados de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de *M.tuberculosis* en los dos Sistemas de Evaluación Mgit™ y Bacter®460TB utilizando las mismas concentraciones de SM y RIF. Tercera Determinación.**

FÁRMACO	Mgit™		Bacter®460TB.	
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
SM	51	1	51	1
INH	27	25	24	28
RIF	36	16	33	19
ET	50	2	50	2

Figura 4.15 Resultados de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de 52 Cepas de *M.tuberculosis* en los dos Sistemas de Evaluación Mgit™ y Bacter@460TB utilizando las mismas concentraciones de SM y RIF. Tercera Determinación.

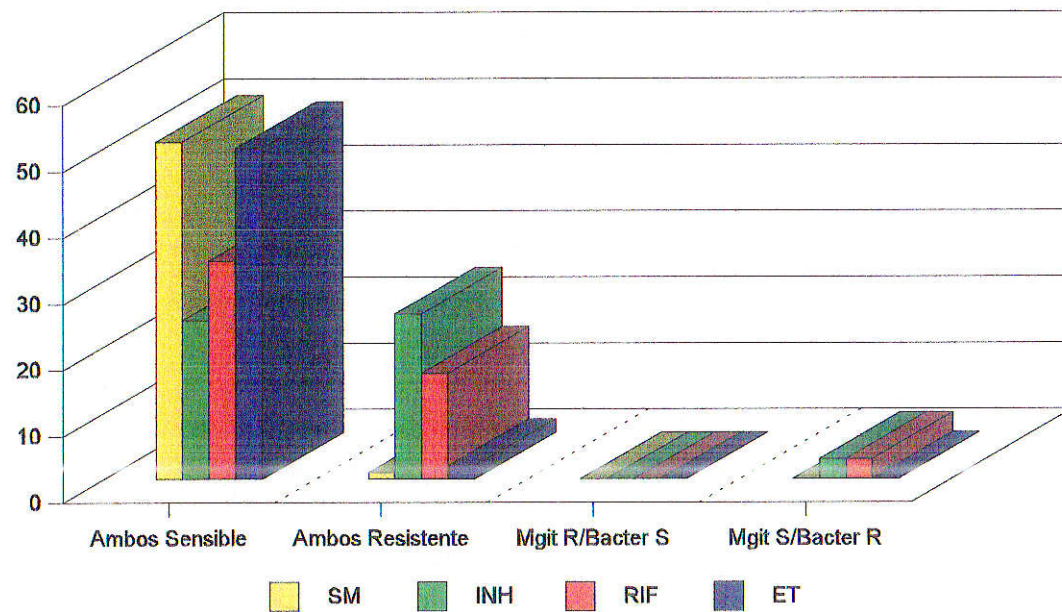


**Tabla 4.16 Comparación de los resultados obtenidos de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bacter®460TB utilizando las mismas concentraciones de SM y RIF. Tercera Determinación.**

FÁRMACO	Mgit™ Versus Bacter®460TB.				
	Ambos Sensible	Ambos Resistente	Mgit R/Bacter S	Mgit S/Bacter R	Concordancia
SM	51	1	0	0	100%
INH	24	25	0	3	94,2%
RIF	33	16	0	3	96,2%
ET	50	2	0	0	100%



**Figura 4.16 Comparación de los resultados obtenidos de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos en los dos Sistemas Evaluados Mgit™ y Bactec®460TB utilizando las mismas concentraciones de SM y RIF. Tercera Determinación.**



determinación, mientras que la concordancia a RIF no varió ya que se seguían manteniendo 3 cepas resistentes en Bactec®460TB pero sensibles en Mgit™

La valoración global del rendimiento de la determinación de sensibilidad a los tuberculostáticos en el sistema Mgit™ utilizando las mismas concentraciones críticas que el sistema Bactec®460TB se recoge en la **Tabla y Figura 4.17**. Es de destacar que en estas condiciones los resultados obtenidos en el sistema Mgit™ son idénticos para la SM y ET a los obtenidos en el sistema Bactec®460TB, y equiparables aunque ligeramente inferiores para INH y RIF. Los valores estimados de sensibilidad, especificidad, fiabilidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los resultados obtenidos en el sistema Mgit™ al compararlos con el método de referencia (sistema Bactec®460TB) se recogen en la **Tabla y Figura 4.11**.

#### **4.3.2. Evaluación de los tiempos de detección.**

Una vez realizado el estudio comparativo de la determinación de la sensibilidad de *M.tuberculosis* en los dos sistemas, el segundo parámetro a analizar era el tiempo medio de interpretación de los resultados en cada uno de ellos y comprobar si alguno se mostraba superior en este aspecto con respecto al otro.

Se ha evaluado el tiempo de crecimiento de las 52 cepas en el sistema Mgit™ en:

- e) Control sin antimicrobiano: Control de crecimiento(inóculo)
- b) Cada uno de los tuberculostáticos utilizados
- c) Cepas sensibles
- d) Cepas resistentes

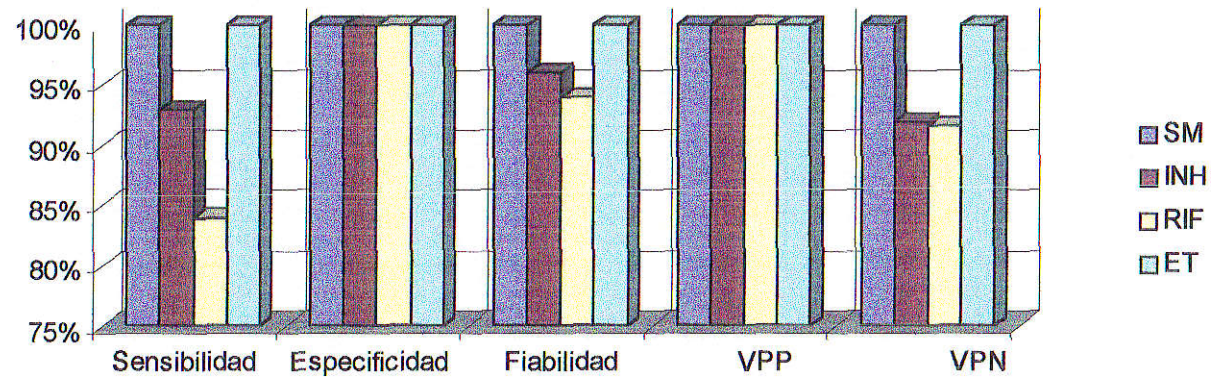
Los tiempos medios de crecimiento en los controles fueron muy similares tanto en las cepas sensibles 5,36 días como en las resistentes de 5,25 días para el ET a 6,00 días para RIF. Es decir, prácticamente todas las cepas resistentes crecieron más o menos al mismo tiempo en los controles como en los tubos que contenían los tuberculostáticos (**Tabla 4.18**).

Las diferencias en el tiempo medio necesario para la lectura e interpretación de los resultados del antibiograma en ambos sistemas fueron muy escasas, aunque estadísticamente significativas ya que el tiempo medio en el sistema Mgit™ para los

**Tabla 4.17 Evaluación global del Sistema Mgit™ en la determinación de la Sensibilidad a los Tuberculostáticos de las 52 Cepas. Tercera Determinación**

	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Fiabilidad</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>
<b>SM</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>
<b>INH</b>	<b>93 %</b>	<b>100 %</b>	<b>96 %</b>	<b>100 %</b>	<b>92 %</b>
<b>RIF</b>	<b>84 %</b>	<b>100 %</b>	<b>94 %</b>	<b>100 %</b>	<b>91.6 %</b>
<b>ET</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>

Figura 4.17 Evaluación global del Sistema Mgit™ en la determinación de la Sensibilidad a los Tibercolostáticos de las 52 Cepas. Tercera Determinación



**Tabla 4.18** Tiempo Medio de Crecimiento en sistema Mgit™ de las Cepas Sensibles y Resistentes y de sus tubos control (CC).

<b>CEPAS RESISTENTES</b>		<b>CEPAS SENSIBLES</b>
<b>Control Crecimiento (CC)</b>	<b>T. de Crecimiento(días) (Fármaco)</b>	<b>Control Crecimiento: 5.36 días</b>
<b>CC:5.60días</b>	<b>SM: 6.20 días</b>	
<b>CGC:5.45días</b>	<b>INH: 5.75 días</b>	
<b>CC:6.00días</b>	<b>RIF: 6.30 días</b>	
<b>CC:5.25 días</b>	<b>ET:5.60 días</b>	

cuatro tuberculostáticos fué de 5 días por 6 días en el sistema Bactec®460TB. A pesar de esta diferencia significativa, no pensamos que tenga realmente importancia ya que en todos los tuberculostáticos el rango de interpretación fué ligeramente superior en el sistema Mgit™, es decir que aunque en algunas cepas la interpretación del antibiograma se adelanta con respecto a la del sistema Bactec®460TB en otras ocurre lo contrario (Tabla 4.19).

Analizando este parámetro de forma individual para cada tuberculostático y diferenciando entre cepas sensibles y resistentes, comprobamos que no existen diferencias significativas en los dos sistemas para SM y ET (Tablas 4.20 y 4.23). En el sistema Mgit™ no encontramos diferencias significativas entre los tiempos de interpretación de las cepas sensibles y resistentes a INH. Sin embargo sí las encontramos al comparar el tiempo de interpretación de las cepas resistentes a INH en el sistema Mgit™ y el sistema Bactec®460TB, debido a que las cepas resistentes crecieron de media un día antes en el sistema Mgit™ (Tabla 4.21). Aunque encontramos una pequeña diferencia en el sistema Mgit™ en el tiempo de interpretación entre las cepas sensibles y resistentes a este fármaco, no la apreciamos en las cepas resistentes al comparar el sistema Mgit™ con el sistema Bactec®460TB. Resultados similares encontramos en el caso de la RIF (Tabla 4.22).

En la valoración global del tiempo de interpretación del antibiograma en ambos sistemas podemos concluir que son equiparables aunque se aprecia una ligera diferencia a favor del sistema Mgit™ en la detección de cepas resistentes a INH sobre el sistema Bactec®460TB, así como en la detección de cepas sensibles sobre las resistentes a RIF

#### **4.3.3. Determinación de la sensibilidad a los tuberculostáticos mediante el método de las proporciones en medio sólido.**

Aunque algunos autores consideran poco fiable la determinación de la sensibilidad a los tuberculostáticos en medio Löwestein-Jenssen, este método es ampliamente utilizado en nuestro país y además se dispone de él comercialmente, por ello en un intento de resolver las discrepancias en los resultados obtenidos con los sistemas Mgit™ y Bactec®460TB decidimos aplicar este método a las cepas en las que obtuvimos resultados discrepantes.

**Tabla 4.19** Análisis Estadístico Global de los tiempos Medios de Detección de las 52 Cepas de *M.tuberculosis* con cada Tuberculostático en los dos sistemas evaluados.

T.Detección	SM		INH		RIF		ET	
	Mgit™	Bactec®460TB	Mgit™	Bactec®460TB	Mgit™	Bactec®460TB	Mgit™	Bactec®460TB
<b>X(Media)</b>	5,4±2,5	6,4±0,4	5,6±2	6,7±1,7	5,5±2	6,1±1	5,4±2	6,5±0,75
<b>Mediana</b>	5,0	6,0	5,0	6,0	5,0	6,0	5,0	6,5
<b>Rango</b>	2-10	4-7	2-11	4-12	2-11	4-9	2-10	4-9
<b>Valor de p</b>	3,6x10 <sup>-4</sup>		1,6x10 <sup>-4</sup>		0,046		3,0x10 <sup>-4</sup>	

**Tabla 4.20** Análisis estadístico de los Tiempos Medios de Crecimiento en la determinación de sensibilidad a Estreptomicina (SM)

Tiempo Detección	SM		
	Mgit™(Sensible) <sup>a</sup>	Mgit™(Resistente) <sup>b</sup>	BACTEC®460TB(Resistente) <sup>c</sup>
Media (X)	5,36±1,9	6,2±1,3	5±1
Mediana	5	6	5
Rango	4-10	5-8	4-6

ab: p = 0,35

bc: p = 0,32



**Tabla 4.21 Análisis estadístico de los Tiempos Medios de Crecimiento en la determinación de sensibilidad a Isoniacida (INH)**

Tiempo Detección	INH		
	Mgit™(Sensible)	Mgit™(Resistente)	BACTEC®460TB(Resistente)
<b>Media (X)</b>	<b>5,2±2,0</b>	<b>5,7±1,0</b>	<b>6,8±2,4</b>
<b>Mediana</b>	<b>5,0</b>	<b>5,0</b>	<b>6</b>
<b>Rango</b>	<b>2-9</b>	<b>3-11</b>	<b>4-12</b>

**ab: p = 0,061**

**bc: p = 0,05**

**Tabla 4.22. Análisis estadístico de los Tiempos Medios de Crecimiento en la determinación de sensibilidad la Rifampicina (RIF)**

Tiempo Detección	RIF		
	Mgit™(Sensible)	Mgit™(Resistente)	BACTEC®460TB(Resistente)
Media(X)	5±1,9	6,3±2,2	5,29±1,51
Mediana	4,5	6	5
Rango	2-8	3-11	4-9

ab:  $p = 3,3 \times 10^{-2}$

bc:  $p = 0,11$

**Tabla 4.23** Análisis estadístico de los Tiempos Medios de Crecimiento en la determinación de sensibilidad a Etambutol (ET)

Tiempo Detección	ET		
	Mgit™(Sensible) <sup>a</sup>	Mgit™(Resistente) <sup>b</sup>	BACTEC®460TB(Resistente) <sup>c</sup>
Media(X)	5,4±2	5,6±2,3	5,6±2,8
Mediana	5	5,5	4
Rango	3-10	3-9	4-9

ab: p = 0,74

bc: p = 0,98

Los resultados obtenidos en este método para las tres cepas (n° 14, 47 y 74 ) discrepantes para RIF y las tres cepas (n° 41,47 y 74) discrepantes a INH clasificadas como sensibles en el sistema Mgit™ y resistentes en el sistema Bactec®460TB se recogen en la **Tabla 4.24** .

En la cepa 14 el método de las proporciones concordaba con el sistema Mgit™ mientras que en la cepa 47 lo hacía con el sistema Bactec®460TB. En la cepa 74 la concordancia con uno u otro sistema dependía de la concentración crítica seleccionada, así esta cepa era resistente a 20 µg de RIF y en cambio sensible a 40 µg. En el caso de la INH la concordancia se produjo con dos cepas con el sistema Mgit™ y en una cepa con el sistema Bactec®460TB.

#### **4.3.4. Determinación de la sensibilidad a rifampicina mediante métodos moleculares.**

De las diecinueve cepas estudiadas resistentes a rifampicina, catorce presentaban mutación en la posición 531 del gen *rpoB* (ser →leu), tres presentaban mutación en la posición 526 (his →asp), una cepa en la posición 513 (gln →leu), y por último doble delección S2 y S4 (codones 510 y 513).

En cuanto a las cepas discrepantes por los dos sistemas de estudio Mgit™ y Bactec®460TB , cepas n°14,47 y 74 presentaban las dos primera mutación en la posición 531 del gen *rpoB* (ser →leu), y la última presentaba doble delección S2 y S4. (**Tabla 4.25**), lo que demuestra que estas tres cepas son realmente resistentes a rifampicina como había detectado el sistema Bactec®460TB

En la **Tabla 4.26** podemos ver las discrepancia que existieron con la RIF por los diferentes métodos estudiados. En la cepa 14 hay una correlación entre Mgit™ y método de las proporciones por una parte, y Bactec®460TB y métodos moleculares por otra. En la cepa 47 hay correlación de todos los métodos menos con Mgit™. Por último en la cepa 74 al valorar el método de las proporciones a la concentración de 20µg concuerda con Bactec®460TB y la de 40µg con Mgit™ y con los métodos moleculares detectamos una mutación en el gen *rpoB* Considerando estos resultados podemos afirmar que los obtenidos por el sistema Bactec®460TB son los que más se acercan a la realidad, que el sistema de las proporciones en medio sólido induce a posibles errores y en el caso del

sistema Mgit™ posiblemente tengan que modificarse las concentraciones de algunos antibióticos como es el caso de la RIF.

**Tabla 4.24** Análisis de los resultados obtenidos por el Método de las Proporciones a RIF y INH en las cepas con resultados discrepantes

RIF	Mgit™	BACTEC®460TB	LÖWENSTEIN-JENSEN	
			20µg	40µg
Cepa 14	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible
Cepa 47	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente
Cepa 74	Sensible	Resistente	Resistente	Sensible

INH	Mgit™	BACTEC®460TB	LÖWENSTEIN-JENSEN	
			0.2µg	1µg
Cepa 41	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible
Cepa 47	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente
Cepa 74	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible

**Tabla 4.25** Análisis de los resultados obtenidos en RIF por Métodos Moleculares en las cepas con resultados discrepantes

<b>RIF</b>	<b>Mgit™</b>	<b>BACTEC®460TB</b>	<b>Método Molecular</b>
<b>14</b>	<b>Sensible</b>	<b>Resistente</b>	<b>Resistente (mutación S531)</b>
<b>47</b>	<b>Sensible</b>	<b>Resistente</b>	<b>Resistente (mutación S531)</b>
<b>74</b>	<b>Sensible</b>	<b>Resistente</b>	<b>Resistente (doble delección S2 y S4)</b>

**Tabla 4.26. Análisis de los resultados obtenidos en RIF por los cuatro métodos todos evaluados en las cepas con resultados discrepantes**

CEPAS	Mgit™	BACTEC®460TB	LÖWENSTEIN		MÉTODOS MOLECULARES
			20µg/ml	40µg/ml	
14	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible	Resistente
47	Sensible	Resistente	Resistente	Resistente	Sensible
74	Sensible	Resistente	Resistente	Sensible	Resistente



**EVALUACIÓN DEL NUEVO SISTEMA Mgit™ PARA EL AISLAMIENTO DE  
*Mycobacterium tuberculosis* EN MUESTRAS CLÍNICAS Y DETERMINACIÓN DE LA  
SENSIBILIDAD A LOS TUBERCULOSTÁTICOS**

---

---

***5.- DISCUSIÓN***

### 5.1.- Mgit™: Nuevo sistema para cultivo de Micobacterias.

El incremento a nivel mundial de la incidencia de la tuberculosis y el aumento en el número de micobacteriosis en pacientes inmunocomprometidos requiere estrategias de cultivo rápidas, eficaces y que puedan ser fácilmente aplicadas en el laboratorio de micobacteriología clínica. Uno de los sistemas de cultivo y detección de micobacterias en muestras clínicas más recientemente desarrollado, es el sistema Mgit™ que se caracteriza por ser un sistema no invasivo, no radiométrico y automatizable de lectura monitorizada continua de los cultivos. El tubo Mgit™ indicador de crecimiento contiene 4 ml de base de caldo Middlebrook 7H9 modificado (Cohn, Youmans)<sup>180,181</sup>. Este medio de cultivo completo, con 0,5 ml de caldo de enriquecimiento OADC y 0,1 ml de mezcla antibiótica PANTA, es uno de los medios líquidos más usado para el aislamiento de micobacterias en muestras clínicas. Cuando se combina con un sensor de oxígeno, el tubo Mgit™ detecta la presencia de micobacterias más rápidamente que con medios a base de agar o de huevo.

En la parte inferior de los tubos de fondo redondo existe un compuesto fluorescente unido a silicona. Este compuesto fluorescente es sensible a la presencia de oxígeno disuelto en el caldo, así inicialmente la gran cantidad de oxígeno presente y disuelto en el medio apaga las emisiones procedentes del compuesto y se puede detectar ninguna o muy poca fluorescencia. Tras la inoculación de la muestra clínica en el medio, si en dicha muestra existen micobacterias éstas al crecer y respirar activamente consumen el oxígeno. Esta disminución en la concentración de oxígeno permite la emisión de la fluorescencia que se observa mediante el uso de un transiluminador ultravioleta de 365 nm o luz ultravioleta de onda larga (lámpara de Wood). El crecimiento también puede ser detectado por la presencia de turbidez no homogénea o pequeños gránulos o copos en el medio de cultivo característico de *M. tuberculosis*.

Aunque el aislamiento de micobacterias se sigue realizando en muchos laboratorios mediante el cultivo en medios sólidos tales como Löwenstein-Jensen o Middlebrook agar, el principal inconveniente de estos medios es su inferior sensibilidad y que el tiempo de recuperación es muy prolongado de 15 - 30 días como mínimo. Los sistemas que utilizan medios líquidos tales como Septi-Check™ o el sistema radiométrico Bactec® 460TB son capaces de detectar micobacterias en mucho menor tiempo, pero a su vez, o bien requieren mucha manipulación o tienen otras limitaciones. El sistema radiométrico Bactec®460TB, que en la actualidad es el mejor sistema por su alta sensibilidad así como

por el corto tiempo de detección del crecimiento (4-15 días), posee ciertas limitaciones como son su alto coste de adquisición y la utilización de isótopos radiactivos ( $C^{14}$ ) con la consecuente generación de residuos radiactivos siendo necesaria una Instalación Radiactiva de 3ª categoría. Así mismo es un sistema invasivo que requiere en la manipulación de la muestra el uso de jeringas y agujas con el riesgo potencial de pinchazos entre los técnicos de laboratorio.

La evaluación preliminar del sistema Mgit™ nos ha permitido comprobar que la mayoría de las especies de micobacterias de interés clínico crecen en dicho sistema y en tiempos variables. Este tiempo depende fundamentalmente de las especies estudiadas así *M. fortuitum* crece en dos días, mientras que *M. tuberculosis* en 6-11 días, siendo la especie *M. avium* con 20-25 días la que más tarde se detecta su crecimiento.

El sistema Mgit™ ha sido desarrollado para evitar algunas de estas limitaciones descritas anteriormente. La utilización de un medio líquido enriquecido determina que uno de los primeros problemas que surge es el de las contaminaciones, especialmente en aquellos laboratorios con poca experiencia en micobacteriología clínica que tradicionalmente han utilizado como único medio de aislamiento en el medio sólido Löwenstein-Jensen. Las tasas de contaminación en los distintos trabajos publicados son muy variables. Así encontramos autores con niveles altísimos como D. Cornfield y K. Gleason<sup>224</sup> 29% en MGIT™ y del 5% en el sistema Bactec®460TB (aunque en una segunda evaluación aumentando la concentración de Hidróxido sódico del 4% al 6% se reduce al 12%) y manteniéndose en el sistema Bactec®460TB. También Tsu-Lan Wu y colaboradores<sup>101</sup> obtienen unos porcentajes de contaminación altos para Mgit™, situándose en el 17%, aunque no habla de los porcentajes de los otros sistemas objeto del estudio (Septi-Check™ y Löwenstein-Jensen). Otros como Palaci y colaboradores<sup>154</sup> y Serrano y colaboradores<sup>93</sup> dan unos valores de 7,8% en Mgit™ y 7,7% en Löwenstein-Jensen respectivamente, que son algo más bajos. En el caso de Pfyffer y colaboradores<sup>97</sup> dan unos niveles de contaminación variable ya que se trata de un trabajo multicéntrico. Así estos valores se mueven entre el 2-6,1% para Mgit™, del 2,4-8,5% en Bactec®460TB, y del 8-9,2% en Löwenstein-Jensen. En el caso de Gaskinsk y colaboradores<sup>98</sup> los índices se sitúan en 10,8% en Bactec®460TB; 10,1 en Löwenstein y del 11,3% en Mgit™. Otros autores como Olson y colaboradores<sup>102</sup> se sitúan en valores del 9,4%, aunque en este caso comparan Mgit™ con Middlebrook 7H11, siendo en este el índice de contaminación del 5,7%.

En la siguiente tabla podemos ver un resumen de los distintos valores de los índices de contaminación según los diferentes autores que han utilizado el sistema Mgit™ (Tabla 5.1).

Nuestros valores son aún algo más bajos, ya que obtenemos un 1,61% para Mgit™ y Bactec®460TB, y del 0,96% en Löwenstein-Jensen. La inferior tasa de contaminación en el sistema Bactec®460TB con respecto al Mgit™, a pesar de que ambos utilizan la misma solución de descontaminación y solución antibiótica, puede explicarse porque el primero es un sistema cerrado: viales herméticos en los que se inocula la muestra mediante aguja y jeringa. En cambio el sistema Mgit™ es abierto, es decir tubos con tapón de rosca, por lo que la posibilidad de contaminación es mayor. Además en el procesamiento de la muestra existe un paso adicional consistente en suplementar cada tubo de medio de cultivo con el suplemento O.A.D.C., lo que supondría incrementar al doble la posibilidad de contaminación simplemente por la manipulación de la muestra. La baja tasa de contaminación en el medio sólido Löwenstein-Jensen se explica en parte por la presencia de inhibidores en el medio, y porque aunque exista contaminación ésta se manifiesta por colonias aisladas y dada la superficie de la lengüeta podemos detectar a pesar de la contaminación la presencia de micobacterias. En general la mayoría de los autores están de acuerdo en que el índice de contaminación está en función del método de descontaminación empleado, de la experiencia del personal de laboratorio y del tiempo transcurrido desde que se recibe la muestra hasta su procesamiento. En nuestro estudio la mayoría de las muestras se procesaban inmediatamente a su recepción y sólo una pequeña parte de las mismas en menos de 18 horas conservándose durante este período de tiempo a 4°C.

Otro problema que se plantea con el sistema Mgit™ es la presencia de falsos positivos. Se define como falso positivo aquellas muestras que muestran fluorescencia y posteriormente no se confirma la presencia de micobacterias en las mismas. Estos falsos positivos pueden ser debidos a contaminaciones bacterianas por deficiente descontaminación de la muestra, y en nuestro caso en su mayoría eran cocos Gram positivos, *Corynebacterium spp* y algunos Gram negativos como *Pseudomonas spp*. Otra causa de falsos positivos es un pH excesivamente alcalino por exceso de sosa en el reactivo descontaminante. Este hecho ocurrió en nuestro estudio en una ocasión afectando a 10 muestras. Este fenómeno se identifica fácilmente ya que todas las muestras procesadas en ese lote se positivizan en 24-48 horas, y además no se detecta crecimiento

**Tabla 5.1. Tasas de contaminación en los diferentes sistemas de aislamiento de *M.tuberculosis* a partir de muestras clínicas.**

<b>AUTORES</b>	<b>SISTEMAS ESTUDIO</b>	<b>% CONTAMINACIÓN</b>
<b>D.Cornefield &amp; Gleason <sup>224</sup></b>	<b>Mgit™, Bactec®460TB</b>	<b>29%(12%) ; 5%</b>
<b>Tsu-Lan Wu y cols <sup>101</sup></b>	<b>Mgit™, Septi-Chek™, Löwenstein</b>	<b>17%</b>
<b>Palaci y cols <sup>154</sup></b>	<b>Mgit™, Löwenstein-Jensen</b>	<b>7,8% y 7,7%</b>
<b>Serrano M.J. y cols <sup>93</sup></b>	<b>Mgit™, Löwenstein-Jensen</b>	<b>7,7%</b>
<b>Pfyffer y cols <sup>97</sup></b>	<b>Mgit™,Bactec®460TB; Löwenstein</b>	<b>2-6,1% ; 2,4-8,5% ; 8-9,2%</b>
<b>Gaskinsk y cols <sup>98</sup></b>	<b>Mgit™,Bactec®460TB, Löwenstein</b>	<b>11,3% ; 10,8% ; 10,1%</b>
<b>Olson y cols <sup>102</sup></b>	<b>Mgit™, Middlebrook 7H11</b>	<b>9,4% ; 5,7%</b>

macroscópico (turbidez en los viales). En este sentido hay autores que dan unos porcentajes de falsos positivos algo elevados como es el caso de Tsu-Lan Wu con un 21,3%<sup>101</sup> y Martínez M.A. y colaboradores con un 23,5%<sup>92</sup>. En relación a este último trabajo hay que decir que utilizaron como solución descontaminante Lauril Sulfato sódico (Tacquet-Tison) que además no se aconseja utilizarlo para realizar el cultivo en Mgit™, ya que se disminuye tanto la recuperación como la rapidez en la misma<sup>222</sup>.

Analizando la rentabilidad de los dos sistemas que utilizan medios líquidos, comprobamos que la rentabilidad fue idéntica en el sistema Mgit™, y el sistema Bactec®460TB con un 15,48% de muestras positivas en ambos sistemas. De estas muestras positivas 5 de ellas fueron contaminaciones en el sistema Mgit™ y otras tantas en el sistema Bactec®460TB, siendo por tanto la rentabilidad definitiva de ambos sistemas del 13,87%. En el medio sólido Löwenstein-Jensen las muestras contaminadas fueron 3 obteniéndose una rentabilidad final en este medio del 12,90%. La sensibilidad de los tres métodos de aislamiento se calculó considerando el total de muestras en las que se aisló *M.tuberculosis* independientemente del medio en que se aislaron. De nuevo la sensibilidad de los sistemas Mgit™ y Bactec®460TB fué idéntica 89,95% siendo un poco inferior 83,33% como era esperable en Löwenstein-Jensen.

En la Tabla 5.2 se recogen los resultados obtenidos por diferentes autores que han utilizado los mismo sistema que los empleado por nosotros en nuestro estudio. De nuevo podemos comprobar que los valores de sensibilidad del sistema Mgit™ obtenidos por los diferentes autores son variables, oscilando desde el 55% de Tsu-Lan Wu et al.<sup>101</sup> hasta el 96,1% de Palaci y colaboradores<sup>154</sup>. En nuestro caso obtuvimos un 89,5% similar al del D.L.Kiska<sup>103</sup> aunque en Bactec®460TB son algo superiores, justo lo contrario a lo que sucede con Gaskinsk y colaboradores<sup>98</sup>. Pfyffer y colaboradores<sup>97</sup> que han realizado el estudio más completo con un total de 1500 muestras procedentes de tres grandes hospitales europeos obtienen una sensibilidad inferior a la nuestra, tanto en Mgit™ como en Löwenstein-Jensen, aunque igual en Bactec®460TB. Serrano y colaboradores<sup>93</sup> encuentran valores muy favorables al Mgit™ con respecto al Löwenstein-Jensen, de 3,1% y 2,23% respectivamente, pero hay que tener en cuenta que de las 25 micobacterias detectadas 7 eran *M.avium* que crecen con dificultad en medios con huevo.

Solamente encontramos un autor, Pfyffer y cols.<sup>97</sup> que presentan datos de la sensibilidad de los sistemas tomados dos a dos. La sensibilidad obtenida de la combinación

**Tabla 5.2. Sensibilidad de los sistemas Mgit™, Bactec®460TB, y Löwenstein-Jensen para el aislamiento de *M.tuberculosis* en muestras clínicas.**

<b>AUTORES</b>	<b>SISTEMAS ESTUDIO</b>	<b>SENSIBILIDAD</b>
Neuman y cols <sup>89</sup>	Mgit™,Bactec460TB®	84%; 78,57%
Gaskinsk y cols <sup>98</sup>	Mgit™,Bactec460TB®,Löwenstein	90,9%; 77,3% ;72,3%
Palaci y cols <sup>154</sup>	Mgit™,Löwenstein-Jensen	96,1%; 96,1%
Serrano M.J. y cols <sup>93</sup>	Mgit™,Löwenstein-Jensen	3,1%; 2,23%
Pfyffer y cols <sup>97</sup>	Mgit™,Bactec®460TB;Löwenstein	81,4%; 89,4%; 75,2%
D.L.Kiska y cols <sup>103</sup>	Mgit™,Bactec®460TB,Löwenstein	90%; 93%; 83%
Tsu-Lan Wu y cols <sup>101</sup>	Mgit™,Septi-Check™,Löwenstein	54,8%; 76,6%; 75,3%

Mgit™/Löwenstein-Jensen fué del 86,7%; para Bactec®460TB/Löwenstein-Jensen del 93,3%; y por último Mgit™/Bactec®046TB del 95%. Nuestros resultados para las mismas combinaciones de sistemas fueron muy similares, con la combinación Mgit™/Löwenstein-Jensen la sensibilidad obtenida fue del 93,75% ligeramente inferior a 95,8% de la alcanzada con Bactec®460TB/Löwenstein-Jensen y también del 95,8% alcanzada con Mgit™/Bactec®460TB. Estas mínimas diferencias nos permiten afirmar que cualquier combinación de los sistemas empleados es adecuada para el diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. Dado el alto coste que supondría la utilización de la combinación Mgit™/Bactec®460TB creemos que la combinación de los sistemas Mgit™/Löwenstein-Jensen es la más idónea ya que evita los problemas de trabajar con isótopos radiactivos que implicaría el sistema Bactec®460TB, al mismo tiempo se utiliza un medio sólido con distinta composición y además nos permite estudiar las características macroscópicas de las colonias que en determinadas circunstancias nos facilitan hacer una identificación presuntiva de las micobacterias así como detectar infecciones mixtas con la ventaja adicional de que al ser un medio sólido la tasa de contaminaciones es inferior.

En el año 1996 los Centers for Diseases Control (CDC) de Atlanta<sup>36</sup> establecieron dos objetivos prioritarios para los laboratorios de micobacteriología clínica:

- a) Se deben de detectar el mayor números de casos de tuberculosis y micobacteriosis.
- b) Esta detección ha de hacerse en el menor tiempo posible no pudiendo superar los 10-14 días desde que se recibe la muestra.

El sistema de cultivo Mgit™, como lo demuestra nuestro trabajo y el de otros autores cumple ampliamente con el primero de dichos objetivos ya que posee una sensibilidad en combinación con cualquier otro sistema cercana al 95 %. El siguiente parámetro que analizamos en nuestro estudio fué el tiempo medio de crecimiento en el sistema Mgit™ para ver si se cumplía el segundo objetivo propuesto por los C.D.C.

En primer lugar observamos que los tiempos medios de detección en las cepas control varió según la especie desde los 2-5 días de las cepas de *M.fortuitun* hasta los 18-25 días de las cepas de *M.avium*. En el caso de *M.tuberculosis* fué de 6-11 días.



La mayoría de los trabajos publicados comparan el sistema Mgit™ con el aislamiento en medio sólido en Löwestein-Jensen, y lógicamente el primer sistema sale muy favorecido. En realidad el sistema Mgit™ surge como posible alternativa al sistema Bactec®460TB por lo que la evaluación comparativa ha de realizarse con éste último.

En nuestro estudio los tiempos globales de detección fueron: de 13,5 (4-22) días en el sistema Mgit™, 14 (3-30) días en Bactec®460TB, y 20,5 (10-40) días, no existiendo diferencias significativas entre los dos sistemas que emplean medios líquidos, pero el tiempo medio de detección en estos dos sistemas fue significativamente más corto que en Löwestein-Jensen como era lógico esperar. Al analizar las muestras en función del resultado de la baciloscopia directa de la muestra, el tiempo de detección fue inferior en los tres sistemas en la muestras baciloscopia positiva variando desde 8 (3-20) días en Mgit™, 10 (4-19) días en Bactec®460TB, y 18 (10-30) días en Löwenstein-Jensen. No hubo diferencias estadísticas significativas en los tiempos de detección encontrados en los sistemas Mgit™ y Bactec®460TB, pero sí entre Mgit™ y Löwenstein-Jensen y Bactec®460TB y Löwenstein-Jensen  $p < 10^{-6}$ .

Este hecho se pone aún más de manifiesto en aquellas muestras que fueron baciloscopia negativa, siendo estos tiempos de 15 (7-30) días en Mgit™, 14,5 (4-22) días en Bactec®460TB, y de 26 (14-42) días en Löwenstein-Jensen. Al igual que en el caso de las muestras baciloscopias negativas, hubo diferencias estadísticas entre los sistemas Mgit™ y Löwenstein-Jensen  $p < 10^{-6}$ , y Bactec®460TB y Löwenstein-Jensen  $p = 2 \times 10^{-6}$ .

Los resultados obtenidos por otros autores se recogen en la Tabla 5.3. Pfyffer y colaboradores<sup>97</sup> encuentran valores muy parecidos, siendo el tiempo medio total de 14 días para Mgit™, para Bactec®460TB de 13,5 días, y para Löwenstein-Jensen de 23,1 días. El tiempo medio de los cultivos con baciloscopia positiva fué de 9,9 días en Mgit™, 9,7 días en Bactec®460TB, y de 20,2 días en Löwenstein-Jensen, y para los cultivos con baciloscopia negativa fueron de 20,3 días en Mgit™, de 18 días en Bactec®460TB, y de 27,2 en Löwenstein-Jensen. D.Cornfield y K.Gleason<sup>224</sup> dan valores para los cultivos con baciloscopia positiva de 14,5 días en Bactec®460TB y de 20,8 días en Mgit™.

**Tabla 5.3. Estudio comparativo de los tiempos medios de crecimiento.**

<b>AUTORES</b>	<b>SISTEMAS ESTUDIO</b>	<b>Tiempos medios de crecimiento</b>
Neuman y cols <sup>89</sup>	Mgit™,Bactec®460TB	13 días (2-64);12 días (2-40) Global
Gaskinsk y cols <sup>98</sup>	Mgit™,Bactec®460TB,Löwenstein	14,2 días;13,2 días;26 días Global.
Serrano M.J. y cols <sup>93</sup>	Mgit™,Löwenstein-Jensen	22,5 días; 37,6 días Global.
Pfyffer y cols <sup>97</sup>	Mgit™,Bactec®460TB;Löwenstein	14 días; 13,5 días; 23,1 días Global 9,9 días; 9,7 días; 20,2 días B(+) 20,3 días; 18 días; 27,2 días B(-)
D.L.Kiska y cols <sup>103</sup>	Mgit™,Bactec®460TB,Löwenstein	11 días; 8 días Global
Tsu-Lan Wu y cols <sup>101</sup>	Mgit™,Septi-Check™,Löwenstein	15,9 días; 24,6 días; 20,9 días Global
Cornfield y cols <sup>224</sup>	Mgit™,Bactec®460TB	14,5 días; 20,8 días B(+)
Wilson,P. y cols <sup>94</sup>	Mgit™,Bactec®460TB,Löwenstein	13,2 (12-1) días;15,7 <sup>13</sup> días; 24,7 (24-4) días
Costa,D. y cols <sup>91</sup>	Mgit™,Löwenstein,Septi-Check™	12,8 días; 27,3 días ; 18,7 días B(+)

B: Baciloscopia

Otros autores sólo realizan una valoración de los tiempos globales de detección sin diferenciar en función de la baciloscopia. Así Serrano y colaboradores<sup>93</sup> dan valores de 22,5 días para Mgit™, y de 37,6 días para Löwenstein-Jensen, que son algo más altos que los nuestros. Por último Palaci y colaboradores<sup>154</sup> dan valores de 12,5 días en Mgit™ y de 19,5 en Löwenstein-Jensen.

En relación con el tiempo medio de crecimiento hay que decir que en nuestro trabajo sólo aislamos la especie *M.tuberculosis* de las 310 muestras clínicas estudiadas, mientras otros autores aislaron otras especies de micobacterias con distintos tiempos de crecimiento lo cual puede influenciar en los tiempos de detección sean variables en función de las especies aisladas.

La experiencia publicada sobre el sistema Mgit™ así como la aportada con nuestro trabajo nos permite concluir que este sistema es más sensible y rápido que el Löwenstein-Jensen y tiene un rendimiento similar al sistema radiométrico Bactec®460TB para la detección de *M.tuberculosis* en muestras clínicas. Por tanto, creemos que el sistema Mgit™ es una buena alternativa al sistema radiométrico y que puede usarse de forma rutinaria en combinación con el aislamiento en medio sólido Löwestein-Jenssen en el laboratorio de micobacteriología clínica. Además en la actualidad el sistema está automatizado y la lectura se hace de forma monitorizada por el propio sistema, lo que evitaría la subjetividad de la lectura, variabilidad entre los observadores así como establecer una escala de valoración de la señal de fluorescencia, lo que mejoraría incluso los resultados obtenidos en este trabajo ya que cuando se llevó a cabo se realizó de forma manual.

## 5.2.- Estudio de la sensibilidad a los Tuberculostáticos.

Los métodos para la evaluación de la actividad de los antimicrobianos frente a las micobacterias difieren considerablemente de los utilizados para otras bacterias. Siguiendo la revisión de Casal<sup>225</sup> podemos agruparlos en cinco grupos:

- 1.- Estudios que comprueban la eficacia clínica en pacientes
- 2.- Estudios experimentales en animales
- 3.- Estudios *in vitro* que tratan de reproducir la condiciones *in vivo*.
- 4.- Estudios en macrófagos y cultivos celulares
- 5.- Estudios *in vitro* de la actividad inhibidora y bactericida.

Los métodos de determinación de la actividad *in vitro* de los tuberculostáticos los podemos agrupar en tres grandes categorías (Tabla 5.4):

- I. Métodos tradicionales
- II. Métodos sencillos que basándose en los principios de los anteriores tratan de acortar el tiempo necesario para la interpretación de los resultados procurando una información rápida al clínico.
- III. Métodos nuevos donde se aplican nuevas tecnologías y métodos de biología molecular con la intención de detectar las cepas resistentes en un período de horas<sup>172-174,226</sup>.

Los métodos sencillos aunque utilizados en algunos laboratorios su uso no se ha generalizado y los métodos nuevos todavía no han sido suficientemente evaluados y aunque algunos de ellos se emplean con fines de investigación no se han incorporado a la rutina del laboratorio de Micobacteriología clínica. Solamente los métodos tradicionales son los reconocidos internacionalmente, están suficientemente evaluados y se aplican de forma rutinaria.

Existen tres métodos tradicionales reconocidos y utilizados internacionalmente para la determinación *in vitro* de la actividad de los tuberculostáticos<sup>124,225-227</sup> que son :

- a. El método de la **Concentración Mínima Absoluta**, en que la ausencia de crecimiento se considera el punto final y permite establecer la **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**.
- b. El **método de las proporciones**, en la cual una determinada proporción del inóculo se considera el punto final.
- c. El método de la **tasa o cociente de resistencia**, que se establece entre la CMI de la cepa problema y la CMI de una cepa de referencia.

Posteriormente en 1981 Siddiqui<sup>187</sup> adapta el método de las proporciones al **sistema radiométrico Bactec®460TB** que es el más ampliamente utilizado en la actualidad. Más recientemente en 1994, Wanger describe la aplicación del sistema de

**Tabla 5.4. Clasificación de los distintos métodos para el cálculo de la susceptibilidad a los tuberculostáticos.**

Métodos convencionales	Métodos sencillos	Métodos rápidos
Concentración absoluta (Meisner 1994)	Portaobjeto (Pryce 1941-Dickinson 1978 )	ATP bioluminiscencia (Beckers 1985)
Método de las proporciones (Canetti 1963)	Examen microscópico de colonia (Runyon 1973)	Hibridación Gen Probe (Kawa 1989)
Cociente de resistencia (Marks 1961)	Método del escobillón (Gangadharam 1969)	Luciferasa <sup>1993</sup>
Método radiométrico (Siddiqi 1981)	Difusión en disco (Wayne y krasnow 1966)	PCR-SSCP (Telenti 1993)
E-test (Wanger 1994) <sup>137-140</sup>		InnoLipA <sup>172-175</sup>
Adaptado de Casal M <sup>225</sup>		

**difusión E-test** a la determinación de la sensibilidad de *M.tuberculosis* que permite establecer la CMI <sup>137-140</sup>.

Todos estos métodos pueden aplicarse de forma **directa**, en aquellas muestras baciloscopia positiva tras concentración de la misma, o de forma **indirecta** una vez aislada la micobacteria de la muestra patológica. La reproductibilidad de los resultados, independientemente de la técnica utilizada, depende de tres factores: a) la estandarización del inóculo, b) protocolos técnicos y c) controles de calidad.

El **método de la concentración absoluta** requiere 2 mg de un cultivo crecido en Löwestein-Jensen de dos semanas de incubación. La presencia de 20 ó más colonias en el tubo que contiene el tuberculostático, tras 4 semanas de incubación, se define como crecimiento y la cepa como resistente. Este método es lento (6 semanas) y muy dependiente del inóculo.

Una variación del método anterior es el método de la **tasa o cociente de resistencia**, en el que se relacionan las CMI de la cepa problema con la de una cepa de referencia *M.tuberculosis* H37Rv. Si el cociente de resistencia es  $\leq 2$  la cepa se define como sensible y como resistente si dicho cociente es  $\geq 8$ . De nuevo las principales limitaciones de este método son la lentitud (6 semanas) y las variaciones en el inóculo.

El **método de las proporciones en medio sólido**, se considera el de referencia. En este método se inocula la cepa problema en 2 medios de cultivo uno con tuberculostáticos y otro libre de ellos. El cociente entre el número de colonias presentes en el medio con antimicrobiano y el medio sin el mismo establece la proporción de resistentes. Por debajo de una determinada proporción la cepa es sensible y por encima resistente. La proporción crítica para Rifampicina, Isoniacida y Etambutol es 1% mientras que para estreptomycin es 10%. Es también un método lento de 4-6 semanas pero no tan dependiente del inóculo. Un adaptación de este método es la determinación de la sensibilidad en el **sistema radiométrico Bactec**, que presenta las ventajas del método anterior pero que le aporta estandarización del inóculo y sobre todo rapidez pudiéndose obtener los resultados entre 5-10 días de su inoculación. Este método es el más ampliamente utilizado en la mayoría de los laboratorios de Micobacteriología clínica y se considera de referencia, por ello cualquier nuevo método que se quiera incorporar debe compararse con éste.

Un grave problema que encontramos en la mayoría de los métodos de determinación de la actividad de los tuberculostáticos frente a *M.tuberculosis* es la gran variedad de medios de cultivo utilizados como son Middlebrook 7H10<sup>48</sup> y 7H11<sup>213</sup> suplementados con OADC y el medio Löwestein-Jensen<sup>240</sup>, la diversidad de concentraciones de antimicrobianos usadas y los criterios de interpretación de las categorías clínicas<sup>225-227</sup>.

La CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) es generalmente definida como la más baja concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento de más del 99% de la población bacteriana sin un período específico de cultivo<sup>228</sup>. La determinación de las CMI de los diferentes fármacos frente a *M.tuberculosis* y otras micobacterias han sido estudiadas con una gran variedad de métodos tanto en medio sólido como Löwestein-Jensen<sup>229</sup>, 7H10 agar y 7H11 agar<sup>230-231</sup> como en medio líquido. Se han empleado diversos criterios para la determinación de la CMI por el método de dilución medio líquido tales como la lectura turbidimétrica<sup>231</sup>, por muestreo y en capa<sup>232-233</sup>, y radiométricamente<sup>211-232-233-234-235</sup>. Recientemente se ha sugerido un método de microdilución en caldo con lectura turbidimétrica para determinar las CMI de las micobacterias de crecimiento lento ya empleado para las micobacterias de crecimiento rápido<sup>236-37</sup>.

La complejidad de los medios de cultivo así como el largo período de incubación requerido para obtener suficiente crecimiento micobacteriano son otras de las variables que inciden en la selección de las concentraciones de los tuberculostáticos utilizadas. Es bien conocido que una cierta proporción de fármaco que se incorpora en los medios sólidos es degradada y el grado de degradación depende de la estabilidad del fármaco y de las características especiales de cada medio. En general, para la mayoría de los fármacos conocidos no se conocen los niveles de absorción y deterioro. A modo de ejemplo citaremos las concentraciones utilizadas de rifampicina que son 4µg/ml en medio Löwestein-Jensen, 2 µg/ml en 7H10 agar, y 4-6 µg/ml en caldo 7H12; o las de etambutol de 2,5,10-7,5µg/ml en dichos medios respectivamente.

El Comité Nacional para los Standard de los Laboratorios Clínicos (NCCLS), recomienda el uso del Middlebrook 7H10 y desaconseja el medio Middlebrook 7H11 y los medios con base de huevo como el Löwestein-Jensen<sup>124</sup>. Las concentraciones de los tuberculostáticos varían en función de los diferentes métodos utilizados como son

dilución, difusión y elución así como en la técnica utilizada concentración absoluta, tasa de resistencia y proporciones (Tablas 5.5, 5.6, 5.7, 5.8).

En base a los estudios iniciales de David<sup>241</sup> se definió la resistencia de *M.tuberculosis* en términos de **concentración crítica**, concepto en el que se basan los métodos de determinación de la sensibilidad en todo el mundo. La definición de las concentraciones críticas se deriva de dos observaciones. Primero el 95% o más de las cepas salvajes de *M.tuberculosis* son totalmente sensibles a los tuberculostáticos de primera línea estreptomina, isoniacida, rifampicina y etambutol. Segundo, el porcentaje de la población tuberculosa que hace que un aislamiento sea diferente a las cepas salvajes se definió por la OMS con un rango que varía desde el 1% (para isoniacida y rifampicina) al 10% (para estreptomina y etambutol) basado en parte de la correlación obtenida con la eficacia terapéutica y por otra en base a los niveles séricos de estreptomina 25-50µ/ml, isoniacida 7µ/ml, rifampicina 10µ/ml y etambutol 2-5µ/ml que se alcanzan con dosis habituales<sup>227-242</sup>. Por razones de uniformidad, ha sido adoptada por los Centros de Control de las Enfermedades (C.D.C) la proporción crítica del 1% para todos los tuberculostáticos en EE.UU. En conclusión, la concentración crítica de un fármaco concreto se define como la concentración de fármaco necesaria para prevenir el crecimiento del 1% de la población (proporción crítica) de *M.tuberculosis* estudiada.

El primer parámetro que analizamos del sistema Mgit<sup>TM</sup> es el tiempo necesario para poder interpretar el antibiograma. En nuestro caso el tiempo medio de detección fué de 5 días, no existiendo diferencias apreciables en cuanto al tiempo de crecimiento en el tubo control y en los tubos con el antimicrobiano ni tampoco entre las cepas sensibles y resistentes. Es importante resaltar que cuando la cepa estudiada es resistente al antimicrobiano evaluado creció generalmente al mismo tiempo que lo hizo en el tubo de control de crecimiento, por lo que incluso la detección de cepas resistentes es más precoz que la de las cepas sensibles.

El tiempo necesario para la interpretación de los resultados de la sensibilidad varió con los distintos antimicrobianos siendo de 6.20 días para SM, 5.75 días para INH, 6.30 para RIF, y de 5.70 días para ET. El tiempo necesario para la interpretación de los resultados de la sensibilidad en sistema Bactec®460tb fue de 6.0 días para SM, INH , RIF y de 6.5 para ET.



**Tabla 5.5. Concentraciones ( $\mu$ /ml) utilizadas en el método de las Concentraciones Absolutas.**

<i>Estreptomycin</i>	2	4	8	16
<i>Isoniacida</i>	0,2	0,4	0,8	1,6
<i>Rifampicina</i>	1	2	4	8
<i>Etambutol</i>	2,5	5	10	20

**Tabla 5.6. Concentraciones ( $\mu$ /ml) utilizadas en el método de la Tasa de Resistencia.**

Estreptomicina	0,78	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50
Isoniacida	0,007	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	
Rifampicina	0,78	1,56	3,12	6,25	12,5	25	50
Etambutol	0,07	0,15	0,31	0,62	1,25	2,5	

**Tabla 5.7. Concentraciones finales ( $\mu$ /ml) utilizadas en el método de elución.**

Estreptomina	0,2	10
Isoniacida	0,2	1
Rifampicina	1	
Etambutol	5	

**Tabla 5.8. Concentraciones ( $\mu$ /ml) utilizadas en el método de las Proporciones en 7H10 Agar, 7H11 Agar y en el Sistema radiométrico.**

	7H10	7H11	Radiométrico
Estreptomicina (baja)	2	2	2
Estreptomicina (alta)	10		6
Isoniacida (baja)	0,2	0,2	0,1
Isoniacida (alta)	1		0,4
Rifampicina	1	1	2
Etambutol (baja)	5	7,5	2,5
Etambutol (alta)	10		7,5

En los distintos estudios recopilados en la **Tabla 5.9**, podemos comprobar que los tiempos de interpretación varían desde menos de cinco días como Bergman y col.<sup>159</sup>, a cinco días como Palaci<sup>154</sup> y Abu-Lawi<sup>160</sup>, hasta superior a los seis días como es el caso de Kodsí y col.<sup>147</sup>, Reisner y col.<sup>151</sup>, Walters y col.<sup>148</sup>, y Pfyffer y col.<sup>157</sup>.

El análisis comparativo de los resultados encontrados por los diferentes autores que evalúan el sistema Mgit™ para la determinación de la sensibilidad de *M. tuberculosis*, plantea grandes dificultades ya que se han utilizado concentraciones muy diversas de los tuberculostáticos estudiados y, así mismo la comparación se ha llevado a cabo con diferentes métodos de referencia.

En los distintos estudios comparativos que hemos revisado la mayoría de los autores utilizan las concentraciones de tuberculostáticos recomendadas por el fabricante, tanto en el sistema Mgit™ como en el sistema Bactec®460tb. Sin embargo hay algunas excepciones, tal como es el caso de Palaci<sup>154</sup> que emplea las concentraciones de referencia en el sistema Mgit™ para INH y RIF (0,1µ/ml y 1 µ/ml respectivamente), pero varía las concentraciones para SM y ET (2 µ/ml y 2µ/ml respectivamente). En este caso la concentración de SM es 1,2 µ/ml más alta de lo establecido, encontrando una correlación en los resultados del 100% y con ET aún siendo la concentración 1,5 µ/ml más baja también la correlación es del 100%.

Otro caso en el cuál se utilizan varias concentraciones de antibiótico es el trabajo de Hagemann y col.<sup>149</sup>, que utilizan tres concentraciones distintas de SM (0.8, 1.0, 1.2 µg/ml) y otras tres distintas de ET (3.0, 3.5, 4.0 µg/ml). En el caso de la SM la concordancia es del 100 % frente a Bactec®460TB para las dos primeras concentraciones, pero con la concentración de 1.2 µg/ml aparecen dos cepas resistentes en Bactec®460TB que se vuelven sensibles en Mgit™. La concordancia de los resultados con ET con los del Bactec®460TB es del 100% para la concentración de 3.5 µg/ml, pero para la de 3.0 µg/ml hay dos cepas sensibles que se vuelven resistentes en Mgit™ y en la de 4 µg/ml hay una cepa resistente en Bactec®460TB pero sensible en Mgit™.

También encontramos que Reisner<sup>151</sup> utilizando 0,1 µg/ml de INH frente a 29 cepas (20 resistentes y 9 susceptibles), y 2,0µg/ml de RIF frente a 28 cepas (9 resistentes y 19 sensibles) sólo aparece una discrepancia en el caso de la RIF. Se trata de una cepa

**Tabla 5.9. Comparación de los distintos resultados publicados sobre sensibilidad a los tuberculostáticos de *M.tuberculosis* en el sistema Mgit™.**

<b>Autor y año</b>	<b>N°Cepas</b>	<b>Sistema Referencia</b>	<b>Fármacos</b>	<b>Correlación</b>	<b>Tiempo Detección</b>
<b>Kodsi y col. <sup>147</sup> 1995</b>	<b>170</b>	<b>Bactec®460TB M.Proporciones</b>	<b>INH RIF</b>	<b>100% 94,6%</b>	<b>7 días</b>
<b>Reisner B. y col. <sup>151</sup> 1995</b>	<b>29</b>	<b>Bactec®460TB</b>	<b>INH RIF</b>	<b>100% 96,55%</b>	<b>6 días</b>
<b>Hagemann <sup>153</sup> 1995</b>	<b>109</b>	<b>M.Proporciones Bactec®460TB</b>	<b>SM ET SM ET</b>	<b>97,24% 97,24% 96,3% 100%</b>	-----
<b>Palaci y col. <sup>154</sup> 1996</b>	<b>25</b>	<b>Método Proporciones</b>	<b>SM INH RIF ET</b>	<b>100% 100% 100% 100%</b>	<b>5 días</b>
<b>1996 Bergman <sup>159</sup></b>	<b>77</b>	<b>Bactec®460TB</b>	<b>INH RIF</b>	<b>93,5% 97,4%</b>	<b>4,6 días</b>
<b>1996 Abu-Lawi <sup>160</sup></b>	<b>138</b>	<b>Bactec®460TB</b>	<b>INH RIF</b>	<b>94,1% 98,5%</b>	<b>5,2 días</b>
<b>1996 Hagemann <sup>149</sup></b>	<b>20 SM 19 ET</b>	<b>M.Proporciones Bactec®460TB</b>	<b>SM ET</b>	<b>100% 100%</b>	-----
<b>1997 Walters <sup>148</sup></b>	<b>117</b>	<b>M.Proporciones</b>	<b>INH RIF</b>	<b>98,29% 99,14%</b>	<b>7,5 días</b>
<b>1997 Nardi <sup>158</sup></b>	<b>250</b>	<b>Bactec®460TB</b>	<b>SM INH RIF ET</b>	<b>97,6% 98% 98% 96,8%</b>	
<b>Pfyffer y col. <sup>157</sup> 1997</b>	<b>96</b>	<b>Bactec®460TB</b>	<b>SM INH RIF ET</b>	<b>100% 100% 100% 98,9%</b>	<b>7,3 días Mgit™ (3-14)</b>

resistentes en Mgit™ y en la de 4 µg/ml hay una cepa resistente en Bactec®460TB pero sensible en Mgit™.

También encontramos que Reisner<sup>151</sup> utilizando 0,1 µg/ml de INH frente a 29 cepas (20 resistentes y 9 susceptibles), y 2,0µg/ml de RIF frente a 28 cepas (9 resistentes y 19 sensibles) sólo aparece una discrepancia en el caso de la RIF. Se trata de una cepa resistente en Bactec®460TB y método de las proporciones pero sensible en Mgit™. Cuando se disminuye la concentración de RIF en el sistema Mgit™ a 1,0 µg/ml dicha cepa se clasifica como resistente, siendo entonces la concordancia del 100% en ambos casos.

En general la correlación entre los sistemas utilizados es superior al 95% aunque existen algunas diferencias entre los diversos estudios. Siguiendo un orden cronológico en el análisis de los resultados obtenidos, comprobamos en los primeros estudios de Kodsi<sup>147</sup>, y Reisner<sup>151</sup> que sólo evalúan la INH y la RIF, encuentran una correlación del 100% en los resultados obtenidos con la INH entre los sistemas Bactec®460TB y Mgit™, y en nuestro caso fué del 93%. En estos dos estudios encontraron una correlación en los resultados con RIF de 94.6% y 96.55% respectivamente, siendo en el nuestro discretamente inferior del 90.4%. Sin embargo Bergman<sup>159</sup> y Abu-Lawi<sup>160</sup> encuentran unos valores de 93,5% y 94,1% en INH y del 97,4% y 98,5% en RIF respectivamente, acercándose más a nuestros valores. En la tercera determinación, cuando utilizamos en el sistema Mgit™ las mismas concentraciones que en el sistema Bactec®460TB, el grado de correlación encontrado por nosotros del 93% en INH y del 95% en RIF son más acordes con los publicados por otros autores.

Walters y col<sup>147</sup> comparan el sistema Mgit™ con el método de las proporciones utilizando sólo dos tuberculostáticos INH y RIF obteniendo una correlación del 98,29% y del 99,14% respectivamente entre ambos métodos.

Otros autores estudian la SM y ET en el sistema Mgit™ y lo comparan con en el sistema Bactec®460TB y el método de las proporciones en Löwestein-Jensen. Uno de ellos es Hagemann y col.<sup>149</sup> que estudian la sensibilidad de 20 cepas a SM y de 19 cepas a ET alcanzando una correlación del 97,24% para SM y ET con el método de las proporciones, y del 96,3% para SM y 100% para ET con el sistema Bactec®460TB. En nuestro caso es del 100 % de correlación en ET y SM comparado con

de las proporciones, encuentran un 100% de correlación entre los resultados de los dos primeros sistemas para el ET, pero encuentra tres discrepancias entre los resultados de estos dos primeros y el método de las proporciones (MP), así tres cepas clasificadas como sensibles en los sistemas Mgit™ y Bactec®460TB lo son como resistentes en el MP. En cuanto los resultados obtenidos con la SM encontró 4 cepas resistentes en el sistema Mgit™ pero sensibles en Bactec®460TB (mismo caso que en nuestro trabajo). Con respecto al MP, hubo tres discrepancias con el sistema Mgit™, dos cepas sensibles en Mgit™ pero resistentes por MP, y una resistente en Mgit™ pero sensible por el MP.

Por último encontramos tres trabajos en los que los autores estudian los cuatro tuberculostáticos de primera línea por el sistema Mgit™ y comparan los resultados obtenidos con los del método de las proporciones, en el caso de Palaci<sup>154</sup>, y con los del sistema Bactec®460TB en el caso de Nardi<sup>158</sup> y Pfyffer<sup>157</sup>. En el de Palaci<sup>154</sup> los resultados de correlación sobre 25 cepas entre Mgit™ y el método de las proporciones son del 100% para los cuatro tuberculostáticos, resultados muy similares a los nuestros: 96% en SM, 98% en INH, 100% en RIF y ET.

En el comparativo de Nardi y col<sup>158</sup> sus resultados sobre 250 cepas fueron 97,6% SM; 98% para INH y RIF; y 96,8% ET. Y los resultados de Pfyffer<sup>157</sup> sobre 96 cepas fueron del 100% para SM, INH, RIF y del 98,9% ET. Nuestros valores son algo más bajos para INH, y RIF (93% y 84% respectivamente), pero superiores para SM y ET (100%). Al utilizar en el sistema Mgit™ las mismas concentraciones que las del sistema Bactec®460TB, estos valores de correlación mejoraron pasando a ser del 95% en RIF.

En relación con las características de las cepas estudiadas en estos trabajos, Palaci y col<sup>154</sup> incluyen 6 cepas resistentes a INH, 5 a RIF, 3 a ET y 2 a SM, número muy inferior a las estudiadas por nosotros especialmente a INH y RIF. Este autor no especifica cuantas de estas cepas eran multirresistentes siendo en nuestro estudio 14 cepas. Nardi y col<sup>158</sup>, no sólo no comenta nada de las cepas multirresistentes, sino que tampoco de las cepas resistentes utilizadas. Únicamente, Pfyffer y col<sup>157</sup> especifica que estudió 5 cepas multirresistentes: 1 resistente a SM/INH, 4 resistente a INH y RIF, y una resistente a los cuatro tuberculostáticos, pero de nuevo estimamos que el número de



cepas monorresistentes no era muy elevado: 2 cepas resistentes a SM, 1 a ET, 8 a INH, y ninguna a RIF.

La mayoría de los trabajos revisados se limitan a exponer sus resultados y constatar las discrepancias encontradas entre los resultados obtenidos con los distintos tuberculostáticos y por los diferentes sistemas empleados. Sólo encontramos tres trabajos que establecen una valoración global del sistema Mgit™ como método para determinar la sensibilidad de *M. tuberculosis* en términos de sensibilidad, especificidad y fiabilidad, que son los de Kodsi<sup>147</sup>, Hagemann<sup>153</sup> y Pfyffer<sup>157</sup> (Tabla 5.10 y 5.11) cuya comparación con nuestros resultados se recogen en las tablas 10 y 11. La sensibilidad y especificidad del sistema Mgit™ para los cuatro tuberculostáticos está cercana al 100% en todos los autores si exceptuamos a Kodsi y nosotros para los resultados con RIF e INH. La mejor valoración global del sistema la obtiene Pfyffer que consiguen un 100% en casi todos los parámetros, exceptuando los de ET, que paradójicamente es que mejor resultado nos da a nosotros. Creemos que estas discrepancias se pueden explicar por el distinto número de cepas resistentes a cada tuberculostático estudiadas en cada estudio. Cuanto menor es el número de cepas resistentes estudiadas mejores son los resultados, así Pfyffer que no incluye ninguna cepa resistente a RIF todos los parámetros para este fármaco son del 100%, mientras que en nuestro estudio incluimos 19 cepas resistentes a RIF los resultados no son tan buenos, en cambio son excelentes para ET (sólo se incluían 2 cepas resistentes) y SM. Por tanto estimamos que aún son necesarios más estudios comparativos y con un mayor número de cepas resistentes a cada uno de los tuberculostáticos para poder evaluar definitivamente este nuevo sistema.

A la vista de los resultados obtenidos en nuestro estudio y a la gran variación en los resultados obtenidos por otros autores nos hemos encontrado con otra dificultad añadida en la valoración del sistema Mgit™, que radica en la ausencia de correlación entre los métodos estudiados inclusive en los considerados o aceptados como referencia, sistema Bactec®460TB y método de las proporciones en medio Löwestein-Jensen. En un intento de dilucidar las discrepancias acudimos a un método de biología molecular que nos permite detectar las mutaciones en el gen *rpoB* que confieren resistencia a rifampicina en *M. tuberculosis*.

En nuestro estudio encontramos tres cepas de *M. tuberculosis* clasificadas como sensibles a RIF en el sistema Mgit™ pero resistentes en el sistema Bactec®460TB. Por

**Tabla 5.10. Sensibilidad, Especificidad, Fiabilidad, Valor predictivo positivo (VPP) y Valor predictivo negativo (VPN ) de algunos estudios**

<b>Autor y año</b>	<b>Fármacos</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Fiabilidad</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>
<b>Kodsi y col. <sup>147</sup> 1995</b>	<b>INH RIF</b>	<b>100% 94,6%</b>	<b>100% 99,2%</b>	<b>100% 98,2%</b>	<b>100% 97,2%</b>	<b>100% 98,5%</b>
<b>Hagemann y col. <sup>149</sup> 1995</b>	<b>SM ET</b>	<b>100% 100%</b>	<b>100% 100%</b>	<b>100% 100%</b>	<b>100% 100%</b>	<b>100% 100%</b>
<b>Hagemann y col. <sup>153</sup></b>	<b>SM SM ET ET</b>	<b>100% 96,92% 100% 91,90%</b>	<b>91,11% 97,5% 100% 100%</b>	<b>96,19% 97,14% 100% 97,4%</b>	<b>93,75% 98,44% 100% 100%</b>	<b>100% 95,12% 100% 95,77%</b>
<b>Pfyffer y col. <sup>157</sup> 1997</b>	<b>SM INH RIF ET</b>	<b>100% 100% 100% 100%</b>	<b>100% 100% 100% 98,9%</b>	<b>100% 100% 100% 99%</b>	<b>100% 100% 100% 50%</b>	<b>100% 100% 100% 100%</b>
<b>2ºDeterminación</b>	<b>SM INH RIF ET</b>	<b>100% 93% 84% 100%</b>	<b>92% 96% 100% 100%</b>	<b>92% 94% 94% 100%</b>	<b>20% 96% 100% 100%</b>	<b>100% 92% 92% 100%</b>

**Tabla 5.11. Sensibilidad, Especificidad, Fiabilidad, Valor predictivo positivo (VPP) y Valor predictivo negativo (VPN) de algunos estudios**

<b>Autor y año</b>	<b>Fármacos</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Fiabilidad</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>
<b>Kodsi y col. <sup>147</sup> 1995</b>	<b>YNH</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
	<b>RIF</b>	<b>94,6%</b>	<b>99,2%</b>	<b>98,2%</b>	<b>97,2%</b>	<b>98,5%</b>
<b>Hagemann y col <sup>149</sup> 1995</b>	<b>SM</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
	<b>ET</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
<b>Hagemann y col. <sup>153</sup></b>	<b>SM</b>	<b>100%</b>	<b>91,11%</b>	<b>96,19%</b>	<b>93,75%</b>	<b>100%</b>
	<b>SM</b>	<b>96,92%</b>	<b>97,5%</b>	<b>97,14%</b>	<b>98,44%</b>	<b>95,12%</b>
	<b>ET</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
	<b>ET</b>	<b>91,90%</b>	<b>100%</b>	<b>97,4%</b>	<b>100%</b>	<b>95,77%</b>
<b>Pfyffer y col. <sup>157</sup> 1997</b>	<b>SM</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
	<b>INH</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
	<b>RIF</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
	<b>ET</b>	<b>100%</b>	<b>98,9%</b>	<b>99%</b>	<b>50%</b>	<b>100%</b>
<b>3ªDeterminación</b>	<b>SM</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
	<b>INH</b>	<b>93%</b>	<b>100%</b>	<b>96%</b>	<b>100%</b>	<b>92%</b>
	<b>RIF</b>	<b>95%</b>	<b>100%</b>	<b>98%</b>	<b>100%</b>	<b>97%</b>
	<b>ET</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

el método de amplificación e hibridación comprobamos que estas tres cepas números 14, 47 y 74 presentaban mutación en el gen *rpoB*, las dos primeras en la posición 531(*ser*→*leu*), y la tercera una doble delección S2 y S4 por lo que los resultados obtenidos con el sistema Bactec®460TB son los que se acercan más a la realidad. Algo parecido sucedió con las discrepancias que seguían existiendo en los resultados obtenidos para la INH en los sistemas Mgit™ y Bactec®460TB. Por métodos moleculares comprobamos que en las tres cepas INH sensibles en Mgit™ pero resistentes en Bactec®460TB había en una de ellas una mutación en el Gen *inhA* y una mutación en el Gen *katG* en las otras dos (comunicación personal), siendo efectivamente resistentes a INH y existiendo por tanto una correlación con los resultados obtenidos por el sistema Bactec®.460TB.

A la vista de los resultados obtenidos y la revisión bibliográfica realizada podemos concluir que entre los diferentes sistemas de determinación de la sensibilidad de *M.tuberculosis* a los tuberculostáticos el sistema radiométrico Bactec® 460TB es el que mejores resultados ofrece. El sistema Mgit™ puede ser una alternativa a éste ya que presenta la ventaja de no utilizar isótopos radiactivos, es automatizable y no invasivo, pero estimamos que son necesarios aún más estudios con este sistema con un mayor número de cepas resistentes para poder establecer de forma definitiva las concentraciones más adecuadas de cada tuberculostático y que su comparación ha de realizarse no sólo con el sistema radiométrico Bactec® 460TB sino que la validación de los resultados debe hacerse con la detección de las mutaciones en los genes implicados en la resistencia de *M. tuberculosis* a los diferentes tuberculostáticos.

**EVALUACIÓN DEL NUEVO SISTEMA Mgit™ PARA EL AISLAMIENTO DE  
*Mycobacterium tuberculosis* EN MUESTRAS CLÍNICAS Y DETERMINACIÓN DE LA  
SENSIBILIDAD A LOS TUBERCULOSTÁTICOS**

---

---

**6.- CONCLUSIONES**

- 1.- La evaluación preliminar del nuevo sistema Mgit™ nos ha permitido comprobar que la mayoría de las especies de micobacterias de interés clínico crecen en dicho sistema y en tiempos variables dependiendo de la especie de micobacteria cultivada.
- 2.- La sensibilidad para el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas de los tres métodos estudiados sistema Mgit™, sistema radiométrico Bactec®460TB y medio Löwenstein-Jensen fue similar, aunque ligeramente superior en los sistemas que utilizan medios líquidos. Ninguno de los tres sistemas detectó el 100% de las muestras positivas.
- 3.- La sensibilidad en el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas se incrementa al combinar los diferentes sistemas empleados. Al existir mínimas diferencias entre las combinaciones utilizadas, creemos que cualquier combinación de dos sistemas es adecuada para el diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias.
- 4.- El tiempo necesario para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras clínicas se acorta significativamente cuando utilizamos los sistemas que emplean medios líquidos en comparación con el aislamiento en medio sólido Löwenstein-Jensen con piruvato. Estas diferencias se ponen aún más de manifiesto en aquellas muestras cuya baciloscopia directa fue negativa
- 5.- Dado el alto coste que supondría la combinación Mgit™/Bactec®460TB creemos que la combinación de los sistemas Mgit™/Löwenstein-Jensen es la más idónea. Esta combinación evita problemas de trabajar con isótopos radiactivos que implicaría el sistema Bactec®460TB, al mismo tiempo se utiliza un medio sólido con distinta composición que nos permite estudiar las características macroscópicas de las colonias, realizar una identificación presuntiva de las micobacterias así como detectar infecciones mixtas.

6.- La experiencia publicada sobre el sistema Mgit™ así como la aportada con nuestro trabajo nos permite concluir que este sistema es más sensible y rápido que el sistema Löwenstein-Jensen y tiene un rendimiento similar al sistema radiométrico Bactec®460TB para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas. En la actualidad el sistema está automatizado y la lectura se hace de forma monotorizada por el propio sistema, lo que evitaría la subjetividad de la lectura, variabilidad entre los observadores así como establecer una escala de valoración de la señal de fluorescencia, lo que mejoraría incluso los resultados.

7.- La evaluación del sistema Mgit™ para la determinación de la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* plantea grandes dificultades ya que no existe uniformidad en las concentraciones de los tuberculostáticos estudiados por los diferentes autores y los estudios comparativos se han realizado con diferentes métodos de referencia.

8.- Los tiempos necesarios para la obtención de resultados en la determinación de la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a los tuberculostáticos en los sistemas Mgit™ y Bactec®460TB fueron inferiores a 7 días, no existiendo diferencias significativas entre sí, pero ambos sistemas en comparación con la determinación en medio sólido Löwenstein-Jensen acortan significativamente este tiempo.

9.- Entre los diferentes sistemas de determinación de la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a los tuberculostáticos el sistema radiométrico Bactec®460TB es el que mejores resultados ofrece y el que mejor se correlaciona con el método molecular de detección de mutaciones en el gen *rpoB* en las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a rifampicina.

10.- El sistema Mgit™ puede ser una alternativa al sistema Bactec®460TB para la determinación de la sensibilidad a los tuberculostáticos. Sin embargo estimamos no obstante que son necesarios más estudios adicionales con este sistema con un mayor número de cepas resistentes para poder establecer de forma definitiva las concentraciones

más adecuadas de cada tuberculostático y que su comparación ha de realizarse no sólo con el sistema radiométrico Bactec®460TB sino que la validación de los resultados debe hacerse con la detección de las mutaciones en los genes implicados en la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los diferentes tuberculostáticos.

11.- El sistema Mgit™ ha demostrado que cumple con los dos objetivos propuestos por los C.D.C. para su incorporación a los laboratorios de Micobacteriología por ser un sistema capaz de diagnosticar rápidamente la mayoría de los casos de tuberculosis y ser capaz de obtener la determinación de la sensibilidad a los cuatro tuberculostáticos de primera línea en una semana.



**EVALUACIÓN DEL NUEVO SISTEMA Mgit™ PARA EL AISLAMIENTO DE  
*Mycobacterium tuberculosis* EN MUESTRAS CLÍNICAS Y DETERMINACIÓN DE LA  
SENSIBILIDAD A LOS TUBERCULOSTÁTICOS**

---

---

***7.- BIBLIOGRAFÍA***

- 1.-Clark,G. World Prehistory.Cambridge University Press 1962,Cambridge.
- 2.-Mcgrath,J.W.Social networks of disease spread in the lower Illinois valley;a simulation approach.Am.J.Phys. Antropol.1988;77:483-496.
- 3.-Steele,J.H.,and A.F.Ranney. Animal tuberculosis.Am.Rev.Tubercul.1958;77:908-922
- 4.-Stead,W.W.Genetics and resistance to tuberculosis.Ann.Int.Med,1992;116:937-94.
- 5.-Hamilton,W.D.,R.Axelrod,and R.Tanese.Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1990;87:3566-3573.
- 6.-Diamond,J.M.The arrow of disease.Discover 1992;13(10):64-73.
- 7.-Bloom,B.R.,and C.J.L.Murray.Tuberculosis:commentary on a reemergent killer.Science 1962;257:1055-1064.
- 8.-WHO Ginebra:Press Tuberculosis Programe.17 Junio,1992.
- 9.-Caminero Luna.J.A.Medidas básicas para el control de la tuberculosis en una comunidad.Medicina Clínica.1994;102:67-73.
- 10.-Kochi,A.The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization.Tubercle 1991;72:1-6.
- 11.-Sepkowitz K.A. and Raffalli.Tuberculosis at the end of the twentieth century.Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.1994;13(11):907-7.
- 12.-American Thoracic Society and Centers for Disease Control.Diagnostic standards and classification of tuberculosis.Am.Rev.Respir.Dis.1990;142:725-735.
- 13.-Stead,W.W.;T.To,R.W.Harrison,and J.H.Abraham.Benefit-risk consideration in preventive treatment for tuberculosis in elderly persons.Ann.Intern.Med.1987; 107:834-845.
- 14.-Brudney K. and Dobkin J.Resurgent Tuberculosis in New York city.Human Immunodeficiency Virus homelessness,and the decline of tuberculosis control programs.Am.Rev.Respir.Dis.1991;144:745-749.
- 15.-Alland D.,Kalkut G.E.,Moss A.R., McAdam R.A.,Hahn J.A.,Bosworth W.,Drucker E.,and Bloom B.R.Transmission of tuberculosis in New York city.N.Engl.J.Med.1994;330(24)1710-1716.

- 16.- Sepkowitz K.E., Raffalli J., Riley L., Khien T.E., and Armstrong D. Tuberculosis in the AIDS era. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(2):180-199.
- 17.- Mckenna M.T., McCray E., and Onorato I. The epidemiology of tuberculosis among foreign-born persons in the United States, 1986 to 1993. *N. Engl. J. Med.* 1995 ; 332(16):1071-76.
- 18.- Barnes P.F., Bloch A.B., Dadidon P.T. and Snider D.E. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 1991; 324:1644-50.
- 19.- Murray J.F. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection during the 1990s. *Bull. Int. Union Tuberc. Lung Disease* 1991; 66:52-28.
- 20.- Barnes P.F. and Barrows S.A. Tuberculosis in the 1990s. *Ann. Intern. Med.* 1993 ; 119:400-410.
- 21.- De Cock K.M., Grant A., and Porter J.D. Preventive therapy for tuberculosis in HIV infected persons: international recommendations, research, and practice. *Lancet* 1995 ; 345:833-36.
- 22.- Narain J.P., Raviglione M.C., and Kochi A. HIV-associated tuberculosis in developing countries: epidemiology and strategies for prevention. *Tubercle* 1992; 73:311-21.
- 23.- Brindle R.J., Nunn P.P., Batchelor B., Gathua S.M., Kimari J.N., Newnham R.S., and Waiyaki P.G. Infection and morbidity in patients with tuberculosis in Nairobi, Kenya. *AIDS* 1993; 7:1469-74.
- 24.- Llorens Teron J., Martinez Roig A. Primoinfección tuberculosa. *Medicine*. 1986; 75:3146-58.
- 25.- Caminero Luna J.A. Proyecto de un programa nacional de control de la tuberculosis para España. *Medicina Clínica*. 1998. 110(1):25-31.
- 26.- Morales M.M., Llopis A., y Ballester M.L. Estudio epidemiológico de la enfermedad tuberculosa en el Hospital La Fe de Valencia. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 1994; 12(82):71-78.
- 27.- Rey R., Ausina V., Casal M., Caylá J., March P., Moreno S., Muñoz F., Ortega A., Vidal R., y Vidal M.L. Situación actual de la tuberculosis en España. Una perspectiva sanitaria en precario respecto a los países desarrollados. *Medicina Clínica*. 1995; 105(18):703-7.
- 28.- March Ayuela P. Situación actual de la tuberculosis en España. *Medicina Clínica*. 1991; 97(12):463-72.

- 29.-March Ayuela P.,y García González A.La evolución de la infección VIH/SIDA en los países desarrollados.Impacto sobre la tuberculosis.Medicina Clínica,1993; 100(5):187-193.
- 30.-March Ayuela P.La transmisión de la resistencia a *M.tuberculosis* en los infectados por el VIH.La llamada tercera epidemia del VIH.Medicina Clínica,1994;102(3):98-100.
- 31.-Frieden T.R.,Sterling T.,Pablos-Méndez A. et al.The emergence drug- resistance in New York city.N.Engl.J.Med. 1993;328(8):521-526.
- 32.-Sauret Valet J.Situación actual de la tuberculosis en España.Conferencia Internacional sobre Tuberculosis ,Granada 1996.
- 33.-Moreno V.,Ortega A.,Valencia E. et al.First outbreak of nosocomial multidrug resistant tuberculosis in AIDS patients in Spain.Fourth European Conference on clinical aspects and treatment of HIV infection ,1994, 355.
- 34.- Grupo de Estudio de Tuberculosis Resistente de Madrid. Estudio transversal multihospitalario de tuberculosis y resistencias en Madrid(Octubre de 1993-Abril de 1994).Medicina Clínica,1996;106(1):1-16.
- 35.-Raviglione M.C.,De Snider Jr,Kochi A.Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic.JAMA 1995;273:220-226.
- 36.-Doern G.V.Diagnostic Mycobacteriology:where are we today?. J.Clin.Microbiol. 1996.34(8):1873-1876.
- 37.-Shinnick T.M.,R.C.Good.Diagnostic Mycobacteriology laboratory practices.Clin. Infect.Dis.1995;21:291-299.
- 38.-Beck-Sague C.,S.W.Dooley ,M.D.Hutton, J.Otten, A.Breeden, J.T.Crawford, A.E.Pitchenik,C.Wooley,G.Cauthern,and W.R.Jarvis.Hospital outbreak of multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis infections.Factors in transmission to staff and HIV-infected patients.JAMA 1992;268:1280-1286.
- 39.-Centers for Disease Control.Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis to health care workers and HIV-infected patients in a urban hospital- Florida and New York.Morbid.Mortali.Weekly Rep.1990;39:718-722.
- 40.-Safi H.,Aznar J., and Palomares J.C.Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Strains during a 3-Year Period(1993 to 1995)in Seville,Spain.J. Clin. Microbiol.,1997,35(10):2472-2476.

- 41.-Aznar J.,Safi H.,Conejo M.C., and Palomares J.C.Molecular epidemiology of tuberculosis in a prison facility in Seville:a 3-year study(1993-1995).Clin. Microbiol. Infect,1997,3(5):586-588.
- 42.-Centers for Disease Control.Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected patients-Florida and New York,1988-1991.Morbid.Mortal.Weekly Rep.1991;40:585-591.
- 43.-Centers for Disease Control.Transmission of multidrug-resistant among immunocompromised persons in a correctional system-New York,1991. Morbid. Mortal.Weekly Rep.1992;41:507-509.
- 44.-Dooley S.W.,M.E. Villarino,M.Lawrence,L.Salinas,S.Amil,J.V.Rullan, W.R. Jarvis,A.B.Bloch,and G.Cauthern.Nosocomial transmission of tuberculosis in a hospital unit for HIV-infected patients.JAMA 1992;267:2632-2634.
- 45.-Fischi M.A.,R.B.Uttamchandani,G.L.Daikos,R.B.Poblete,J.N.Moreno, R.R. Reyes,A.M.Boota,L.M.Thompson,T.J. Cleary,and S.Lai.An outbreak of tuberculosis caused by multiple-drug-resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection. Ann.Intern.Med.1992;117:177-183.
- 46.-Pearson M.L.,J.A.Jereb,T.R.Frieden,J.T.Crawford,B.J.Davis,S.W.Dooley,and W.R.Jarvis.Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*.A risk to patients and health care workers. Ann.Intern.Med.1992;117:191-196.
- 47.-Centers for Disease Control and National Institutes of Health.Biosafety in microbiological and biomedical laboratories,2nd. ed.In J.H.Richarson and W.E.Barkley (ed.),HHS Publication No.(NIH).88-8395.U.S.Government Printing Office, Washington,D.C.,1988.
- 48.-Kent P.T.,and G.P.Kubica.Public health mycobacteriology:a guide for the level III laboratory.Centers for Disease Control,Atlanta 1985.
- 49.-Casal Roman M.Microbiología clínica de las Enfermedades por Micobacterias. Tuberculosis,Lepra,y Micobacterias.ED Universidad de Córdoba. Córdoba 1991.
- 50.-Nolte F.S. and Metchock B.*Mycobacterium*. En :Murray P.R.,Baron E.J., Pfaller M.A.,Tenover F.C. and Yolken R.H.Manual of Clinical Microbiology.American Society of Microbiology Press.Washington 1995.
- 51.-Salfinger M.and Pfyffer G.E.The new diagnostic Mycobacteriology laboratory.Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.1994;13(11):961-169.

- 52.-Wolinsky E. Conventional diagnostic methods for tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 1994;19:396-401.
- 53.-Tenover F.C., Crawford J.T., Huebner R.E., Geiter L.J., Horsburgh C.R. and Good R. The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready? *J. Clin. Microbiol.* 1993;31(4):767-770.
- 54.-Shinnick T.M. and Good R.C. Diagnostic Mycobacteriology practices. *Clin. Infect. Dis.* 1995;21:291-9.
- 55.-Rey Durán R. y Melero Moreno Moreno C. Tuberculosis. *Medicine.* 1992; 6 (24) :1077-87.
- 56.-Martin Casabona N. y Vidal Pla R. Clínica y diagnóstico de la tuberculosis. *Medicine.* 1989;31:1250-57.
- 57.-Smithwick R.W., Bigbie M.R., Ferguson R.B., Karlix M.A., and Wallis C.K. Phenolic Acridine Orange Fluorescent Stain for Mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* , Oct. 1995,35(10):2763-2764.
- 58.-Huebner R.E., Good R.C., and Tokars J.I. Current Practices in Microbiology: Results of a Survey of State Public Health Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* , 1993,31:771-775.
- 59.-Cummings, D.M. et al. Radiometric detection of the metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Nucl. Med.* 1975;16:1189-1191.
- 60.-Damato J.J., Collins M.T., Rothlauf M.V., and McClatchy J.K. Detection of mycobacteria by radiometric and standard plate procedures. *J. Clin. Microbiology* . 1983;17:1066-1073.
- 61.-Deland, F.H. and H.N. Wagner, Jr. Early detection of bacterial growth with carbon-14 labeled glucose. *Radiology.* 1969,92:154-155.
- 62.-Gill, V.J., Park C.H., Stock F., Gosey L.L., Witebsky F.G., and Masur H. Blood cultures for mycobacteria. *J. Med. Microb.* 1985.22:543-546.
- 63.-Stager, C.E. et al. Enhanced recovery of mycobacteria with the BACTEC 460 using larger inoculum and medium volume. Abstract U36, American Society of Microbiology Annual Meeting, 1986, Washington, D.C.
- 64.-Stager, C.E. and J.R. Davis. BACTEC enrichment procedure for mycobacteria isolation. Abstract U75, American Society of Microbiology Annual Meeting, 1987, Atlanta, GA.

- 65.-Gross,W.M. and J.E.Hawkins.Rapid radiometric testing of *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory.Abstract 1011,I.C.A.A.C.Annual Meeting 1984, Washington,D.C.
- 66.-Tice,L.S.and G.D.Roberts.Optimal recovery of mycobacteria from clinical specimens,using a radiometric(BACTEC) method.Abstract U38, American Society of Microbiology Annual Meeting,1986, Washington,DC.
- 67.-Rezusta A.,Mairal M.P.,Ferrero M.,Jiménez M.S.Estudio Comparativo de la Sensibilidad de *M.tuberculosis* por el Método de las Proporciones y el Sistema Radiométrico BACTEC.Poster SPO-02 4.VII Reunión del Grupo Español de Micobacteriología 1996, Zaragoza,España.
- 68.-Bannister,E.R. et al.Comparison of detection,identification and drug susceptibility testing of micobacteria by using the BACTEC radiometric method and conventional methods.Abstract C260, American Society of Microbiology Annual Meeting 1985,Las Vegas.
- 69.-Middlebrook,G. et. al.Automatable radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media.Am.Rev.Respir.Dis.1977;115:1066-1069.
- 70.-Morgan,M.A. et al.Comparison of three culture methods for the radiometric detection of mycobacteria from clinical specimens.Abstract C222, American Society of Microbiology Annual Meeting,1983,New Orleans,LA.
- 71.-Morgan M.A.,Horstmeier ,De Young R.D.,and Roberts G.D.Comparison of a radiometric method(BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens.J.Clin.Microbiol,1983;18:384-388.
- 72.-Takahashi H., and Foster V.Detection and recovery of mycobacteria by a radiometric procedure.J.Clin.Microbiol.,1983;17:380-381.
- 73.-Park,C.H. et al.Rapid recovery of mycobacteria from clinical specimens using automated radiometric technic.Am.J.Clin.Path,1984;81:341-345.
- 74.-Siddiqi,S.H. et al.Rapid radiometric methods to detect and differentiate *Mycobacterium tuberculosis*/*M.bovis* from other mycobacterial species.Am.Rev.Respir.Dis.1984;130:634-640.
- 75.-Siddiqi,S.H.Studies to further enhance mycobacterial growth in radiometric 7H12 Medium.Abstract U-46, American Society of Microbiology Annual Meeting,1985,Las Vegas,NV.

76.-Strand,C.et al.Evaluation of a new simpler radiometric mycobacterial blood culture method.Abstract C385, American Society of Microbiology Annual Meeting,1987,Atlanta,GA.

77.-Stager E.C.,Libonati P.,Siddiqi S.H. et al.Role of solid media when used in conjunction with BACTEC system for mycobacterial isolation and identification.J.Clin.Microbiol.,1991;29:154-157.

78.-Zapata P.,Montiel A.,y Aznar J.Detección de Micobacterias en muestras clínicas utilizando Tubo Indicador de Crecimiento Micobacterias(BBL®MGIT).p.60.VI Reunión del Grupo Español de Micobacteriología.Valladolid,1995.

79.-Zapata P.,Arbeloa M.,y Aznar J.Detección de micobacterias en muestras clínicas utilizando tubo indicador de crecimiento de micobacterias BBL®MGIT™.VII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.Torremolinos.Málaga 1996.

80.-Stitt,D.T.,T.L.Parks,J.C.Mellarkey,and J.E.Tanner.A Rapid Nonradiometric Method for Detecting the Growth of Mycobacteria.Poster N°533,page 159 . 6<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,1993,Seville,Spain.

81.-B.A.Hanna,S.B.Walters,S.E.Kodsi,D.T.Stitt,P.M.Tierno,L.J.Tick.  
Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Directly from Patient Specimens with the Mycobacteria Growth Indicator Tube;A New Rapid Method.In Abstract of the 94<sup>th</sup> General Meeting of the American Society of Microbiology 1994 ,Las Vegas,Nevada.

82.-David T.Stitt and Salma E.kodsi.A Rapid Method for the Growth and Detection of Mycobacteria in Clinical and Stock Cultures.In Abstracts of the 94<sup>th</sup> General Meeting of the American Society of Microbiology 1994,Las Vegas,Nevada.

83.-Muller-Serieys C.,Pierre J.,Nouhouayi A. and Bergogne-Berezin E.Detection of Mycobacteria in Clinical Specimens using Mycobacterial Growth Indicator Tube. Abstract,N°191.7<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,1994,Vienna,Austria.

84.-Beaty P.S.,Ahnell J.,Robinson L.,Deal M.Detection of Mycobacterium tuberculosis Using a Fluorescence Quenching-Based Oxygen Sensor.Presented at the 1994 Annual American Society of Microbiology Meeting,Las Vegas,Nevada.

85.-Rusch-Gerdes S.,Cieslak C.Detection of Mycobacteria from specimens with the Mycobacteria Growth Indicator Tube(MGIT). Abstract N°352,7<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,1995 Vienna,Austria.



- 86.-Pfyffer G.E. An Assessment of Growth-Based Technologies for the isolation of Mycobacteria (Slide Presentation). p.B-1;B-4. 7<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1995, Vienna, Austria.
- 87.-Stitt D.T., J.D. Douglass, P.A. Hagermann, S.E. Kodosi. A rapid Method for the Detection of a Wide Variety of Mycobacteria. p.B-19;B-21. 7<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases .1995 Vienna, Austria.
- 88.-Lue Y.A., B. Visot, G. Brophy. Rapid Detection of *Mycobacterium avium* Complex (MAC) from Blood Specimens with the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT). 95<sup>th</sup> General Meeting of the American Society of Microbiology ,Poster N°U149 1995. Washington D.C., USA.
- 89.-Neumann, M.A., J. Rogers, R. Williams, S. Maxwell. Comparison of the New Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with the Bactec 460TB System for the Rapid Detection of Mycobacteria from Clinical Specimens. Abstr. B39-B40. 16<sup>th</sup> Annual Meeting of European Society of Microbiology , 1995, Pisa, Italy.
- 90.-Rippin K., J. Pohlman, G. Hall. Comparison of BBL MGIT vs. Bactec 460 for the Detection of *Mycobacterium* sp. In Abstracts of the 95<sup>th</sup> General Meeting of the American Society of Microbiology , Washington D.C., May 1995.
- 91.-Costa D., F. Mandler, C. Passerini Tosi, V. Penati, C. Piersimoni et al. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT). A New Rapid Non-Radiometric Method in Mycobacteria Diagnosis. Abstr. B1. 16<sup>th</sup> Annual Meeting of European Society of Microbiology 1995, Pisa, Italy.
- 92.-Martínez M.A., Nogales M<sup>a</sup>.C., Gutiérrez M<sup>a</sup>.J., Bernal S., Chávez M., Martín-Mazuelos E. Estudio Comparativo de Dos Medios de Cultivo para el Aislamiento de Micobacterias. Poster SPO-01 10.VII Reunión del Grupo Español de Micobacteriología (GEM) , 1996, Zaragoza, España.
- 93.-Ruiz-Serrano M.J., García-Lechuz J.M., García-Garrote F., Vasallo F.J., Alcalá L. , Bouza E. MGIT: Una Alternativa para el Diagnóstico Rápido de Micobacterias. Poster SPO-02 10.VII Reunión del Grupo Español de Micobacteriología (GEM), 1996, Zaragoza, España.
- 94.-Wilson P., Cutler R.R. and Clarke F.V. UK Evaluation of the BBL® Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT™) for the detection of Mycobacteria in Clinical Specimens. Abstr. C17. 96<sup>th</sup> General Meeting of the American Society of Microbiology 1996, New Orleans, Louisiana, USA.
- 95.-Fairfax M.R., Beddredine S. Rapid Detection of Mycobacteria: Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) versus Middlebrook 7H11 plates. Abstract N°U35. 96<sup>th</sup> General Meeting of the American Society of Microbiology , 1996, New Orleans, USA.

96.-Kucera J.,Skidmore D.,Waal W.,Whisenant B.,Newcomb-Gayman P. Comparison of Mycobacteria Growth Indicator Tube to Bactec Methodology. Abstract N°U36 .96th American Society of Microbiology General Meeting,1996,New Orleans , USA.

97.-Pfyffer G.E.,Welscher H.M.,Kissling P.,Cieslak C.,Casal M.,Gutierrez J.,and Rüschi-Gerdes S. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube(MGIT) with Radiometric and Solid Culture for Recovery of Acid-Fast Bacilli. Journal of Clinical Microbiology,1997,35(2):364-368.

98.-Gaskins D.,Kirkman A.M.,Amos E.,Rand K. Comparison of BBL® MGIT, BACTE® 460TB and Löwenstein-Jensen for the isolation of Mycobacterium Species. Prog.C342. 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,1997,Lausanne,Switzerland.

99.-Humphries J.,Stone P.,and Sulton P. An Evaluation of Mycobacterial Culture Methods. Prog.U148 . 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases , 1997,Lausanne,Switzerland.

100.-Stitt D.T. and Sturm K.M. Preliminary Growth Requirements of *Mycobacterium paratuberculosis* in the BBL®MGIT. Prog.U152 . 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ,1997,Lausanne,Switzerland.

101.-Tsu-Lan Wu,An-Ming Wang,Chien-Feng Sun. Comparison of Septi-Check AFB Bottle, Mycobacterium Growth Indicator Tubes and Conventional Method Löwenstein-Jensen Slant/Middlebrook Plate for isolation of Mycobacteria from Clinical Specimens. Abstract N° C5. 96th General Meeting of the American Society for Microbiology,1996,New Orleans,Loussiana.USA.

102.-Olson D.O.,Graham R.,and Moody J.A. Enhanced of Mycobacteria (AFB) by Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT™) Compared to Microcolony M7H11 Agar Method. Abstract C24. 96th General Meeting of the American Society for Microbiology ,1996,New Orleans,Loussiana.USA.

103.-Kiska D.L.,Badak F.Z.,Setterquist S.,Hartley C.,O'Connell M.A.,Hopfer R.L. Comparison of Mycobacterial Growth Indicator Tube(MGIT™) With Bactec®460 for Recovery of Mycobacteria. Abstract N°C13. 96th General Meeting of the American Society for Microbiology ,1996,New Orleans,Loussiana.USA.

104.-Warns M.,Hagemann P.,Beaty S. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 Automated Sistem for the Growth and Detection of Mycobacteria from processed sputum Specimens. Prog.N°687 . 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1997 Lausanne,Switzerland.

- 105.-Villar J.,Navarro M<sup>a</sup>.R.,Alcaraz A.,Muñoz C.,Carbajal J.A.,Borrás R.**  
Evaluación del Sistema BACTEC 9000 MB para la Detección de Micobacterias en Muestras Clínicas.Poster SPO-01 3. VII Reunión del Grupo Español de Micobacteriología,1996,Zaragoza,España.
- 106.-Jesús de La Calle I.,Ybarra de Villavicencio M<sup>a</sup>,Pérez-Ramos S.**Evaluación de un Nuevo Sistema Automatizado de Detección de Micobacterias(9000 TB).Poster SPO-01 5. VII Reunión del Grupo Español de Micobacteriologia,1996 Zaragoza,España.
- 107.-Van Griethuysen A.J.,Jansz A.R.,and Buiting A.G.M.**Comparison of Fluorescent BACTEC® 9000MB System,Septi-Chek AFB System,and Lowenstein-Jensen Medium for Detection of Mycobacteria.J.Clin.Microbiol. 1996,34:2391-2394.
- 108.-Zanetti S.,Ardito F.,Sechi L.,Sanguinetti M.,Molicotti P.,Delogu G.,Pinna M.P.,Nacci A.,Fadda G.**Evaluation of a Nonradiometric System(BACTEC 9000MB)for the Detection of Mycobacteria in Human Clinical Samples. J.Clin.Microbiol. 1997,35(8):2072-2075.
- 109.-Rüsch-Gerdes,M.Pfohl.**Comparison of the BACTEC® 9000MB with BACTE® 460 and Solid Media for Recovery of Mycobacteria from Nonrespiratory Specimens . P683 . 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases , 1997,Lausanne,Switzerland.
- 110.-Silberman R. ,Oberle A.D.,Monroe D.K.,Shope J.M. and Rogers G.B.**Clinical Comparison of the BACTEC® 9000MB Myco/F Sputa Bottle and Mycobacteria Growth Indicator Tube for Detection of Mycobacteria.Program N°C341. 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,1997, Lausanne,Switzerland.
- 111.-Fuller D.,Davis T.,Dumond J.,Milish M.,and Lineback P.T.**Comparison of BACTEC® 9240 MYCO/F Lytic Blood Culture Medium to BACTEC® 460TB System 13A Medium for the recovery of Mycobacteria in Blood.Program N° C431 . 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ,1997, Lausanne,Switzerland.
- 112.-Razeq J.,Abu-Lawi K.,Samarrai W.,Gullans C.R.,and Sierra M.F.**Evaluation of BACTEC® MYCO/F Bottle for the Detection of Mycobacteria in Blood in the BACTEC® 9240.Program N° C338 . 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ,1997,Lausanne,Switzerland.
- 113.-Sorondo G.,Rendo A.,Rankin I.,and Boyle J.F.**Comparison of the BACTEC® 9000MB,BACTEC® 460TB and Conventional Culture in the Detection of Mycobacteria from Non-Pulmonary Specimens.Program N° U154. 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,1997, Lausanne, Switzerland.

- 114.-Mosca A.,D'Alagni M.,Del Prete R.,Simone A.,De Santis A., and Miragliotta G.Rapid recovery of M.tuberculosis complex from clinical specimens using the BACTEC® 9000MB system,a new automated fluorimetric technique. Clin.Microbiol.Infect. 1997;43(3):352-55.
- 115.-Woods G.L.,Fish G.,Plaunt M.,and Murphy T.Clinical evaluation of Difco ESP Cultures System II for growth and detection of Mycobacteria.J.Clin.Microbiol. 1997;35(1):121-24.
- 116.-Tortoli E.,Cichero P.,Chirillo M.G.,Gismondo M.R.,Bono L.,Gesu G.,Simonetti M.T.,Volpe G.,Nardi G.,and Marone P.Multicenter comparison of ESP culture system II with Bactec 460 TB and Löwenstein-Jensen medium for recovery of Mycobacteria from different clinical specimens,including blood.J.Clin.Microbiol. 1998,36(5):1378-1381.
- 117-Postulka A.,Geis G. and Opfer Kuch W.Clinical comparison of MB/Bact Mycobacteria Detection System with the Radiometric BACTEC® 460TB System. Abs.Nº:U-38. 96th General Meeting of the American Society for Microbiology, 1996,New Orleans,USA.
- 118.-Magee J.G.,Freeman R.,Barret A.Experience with the MB/Bact Mycobacteria Automated Culture System for Mycobacteria.System.Specimens. Abs.Nº:U-37. 96th General Meeting of the American Society for Microbiology , 1996,New Orleans,USA.
- 119.-Tórtola Fernández M.T. y Arcalis Arce L.Valoración del Sistema de Cultivo BACT-Alert. Abs.Nº:MRS-01,2.1.VII Reunión del Grupo Español de Micobacteriología .1996. Zaragoza.
- 120.-Coll P.,Moreno C.,Garrigó M.,Rodriguez P. y García E.Comparación de los Sistemas MB/Bact y BACTEC® 460TB y el medio Löwenstein-Jensen para el aislamiento de Micobacterias.Clínicas. Abs.Nº:MRS-01,2.2.VII Reunión del Grupo Español de Micobacteriología.1996.Zaragoza.
- 121.-Vitoria A.,Ramos G.,García C.,Molina J. y Rubio C.Comparación MB/Bact™ y Bactec® 460 TB Radiométrico para el aislamiento de Micobacterias en muestras clínicas. Abs. Nº:MRS-01,2.3. VII Reunión del Grupo Español de Micobacteriología. 1996.Zaragoza.
- 122.-Horn J.Redox system as bacterial growth indicators;Biotest Bulletin 1995; 181-185.
- 123.-Naumann L. et al.Evaluation MB Redox.Comparison of a new Liquid Medium with Solid Media and the BACTEC® 460 TB.J.Lab.Med.1997;21(1):31-34.

- 124.-National Commitee for Clinical Laboratory Standards.** Antimicrobial susceptibility testing for *M.tuberculosis*; Tentative standard. NCCLS document M24-T. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087, USA 1995
- 125.-Siddiqi S.H., Libonati J.P., Middlebrook G.** Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *M.tuberculosis* .J.Clin.Microbiol. 1981;13:908-91.
- 126.-Broman,R.L. et al.** Direct drug susceptibility testing of micobacteria using rapid radiometric sistem. Abstract C192, American Society for Microbiology Annual Meeting , 1982, Atlanta, GA.
- 127.-Siddiqi,S.H. et al.** Accuracy and reproductibility of the BACTEC drug susceptibility testing of *M.tuberculosis*. Abstract 1041, I.C.A.A.C. Annual Meeting 1983, Las Vegas, NV.
- 128.-Fadda,G. and S.Roe.** Recovery and susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from extrapulmonary specimens by the BACTEC radiometric method. J.Clin.Microbiol. 1984;19:720-721.
- 129.-Hawkins,J.E. et al.** Radiometric drug susceptibility testing of *Mycobacterium kansasii* and *M.marinum*. Abstract 1200, I.C.A.A.C. Annual Meeting 1984. Washington, D.C., USA.
- 130.-Siddiqi,S.H. et al.** Determination of minimal inhibitory concentrations(MICs) of antituberculosis drugs for *Mycobacterium tuberculosis* using radiometric and agar dilution methods. Abstract 1201, I.C.A.A.C. Annual Meeting 1984, Washington, DC. USA.
- 131.-Libonati,J.P. et al.** Identification and direct drug susceptibility testing of mycobacteria by the radiometric method. Abstract C300, American Society of Microbiology Annual Meeting 1984, St.Louis, USA..
- 132.-Bannister,E.R. et al.** Comparison of detection, identification and drug susceptibility testing of micobacteria by using the BACTEC radiometric method and conventional methods. Abstract C260, American Society of Microbiology Annual Meeting 1985, Las Vegas. USA.
- 133.-Siddiqui S.** BACTEC®460TB System. Product and Procedure Manual, MA-0029. Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, 1995, Sparks, Md.
- 134.-Augustynowicz-Kopec E., Zalewska-Schönthaler N., Zwolska Z.** Comparison Sensitivity Between Radiometric Method and Conventional Methods in Diagnosis of Tuberculosis in Scanty-Bacillary Specimens. Abstract N°1314. 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1995, Vienna, Austria.

- 135.-Rezusta A.,M.P.Mairal,M.Ferrero,M.S.Jiménez.Estudio Comparativo de la Sensibilidad de *M.tuberculosis* por el Método de las Proporciones y el Sistema Radiométrico BACTEC® Poster SPO-02 4. VII Reunión del Grupo Español de Micobacteriología, 1996,Zaragoza,España.
- 136.-J.C.Alados,J.A.García,J.Serrano,C.Miranda,S.Sanbonmatsu,M.de la Rosa.Micobiograma para *Mycobacterium tuberculosis* en Tubos de Middlebrook 7H10.Comparación con Löwenstein-Jensen y BACTEC 7H10.SCO-01 6. VII Reunión del Grupo Español de Micobacteriologia,1996,Zaragoza,España.
- 137.-Wanger A. and Mills K.Etest for susceptibility testing of *M.tuberculosis* and *M.avium intracellulare*.Diagn.Microbiol.Infectious Diseases. 1994.19:179-181.
- 138.-Wanger A.,Mills K.,and Boulet B.Comparison of Etest and agar dilution for susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. Poster no.C-117,1994(H). American Society for Microbiology(ASM),1996,New Orleans,
- 139.-Wanger A. and Mills K.Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibility to Ethambutol,Isoniazid,Rifampin,and Streptomycin by Using Etest.J.Clin. Microbiol.,1996,34:1672-1676.
- 140.-Wanger A.,Boulet B., and Mills K.Susceptibility Testing of *M.kansasii* Using Etest. Poster:U-61. 96th General Meeting of the American Society of Microbiology,1996,New Orleans,USA.
- 141.-Aznar J.Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis.IV Congreso Nacional sobre SIDA.Diciembre 1996.
- 142.-Kurzynski T.,Petri D.,Fett D.,and Schell R.Reliability of the E-test for Antimicrobial Testing of Rapidly Growing *Mycobacterium species*.Poster N°U-62.. 96th General Meeting of the American Society of Microbiology ,1996,New Orleans.USA.
- 143.-Canneti,G. et al.Advances in techniques of testing mycobacterial drug susceptibility,and the use of sensitivity test in tuberculosis programmes. Bull.W.H.O. 1969;41:21-43.
- 144.-Zapata P.,Arbeloa M.,Aznar J.Evaluation of BBL®MGIT™Mycobacterial Growth Indicator Tube for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Abs.N°:P1081. 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.Lausanne,Switzerland,May 1997.
- 145.-Hanna B.A.,S.Steinberg,D.T.Stitt,T.L.Parks,P.M.Tierno,andL.J.Tick.Rapid Drug Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* by a Fluorescence Quenching Method.Abstract N°U-21. 93<sup>rd</sup> General Meeting of the American Society of Microbiology, 1993, Washington D.C., USA.

146.- Kodsí S.E.,Hagemann P.A.,Douglass J.P.,Stitt D.T.A method to perform Bactec 460TB system susceptibility testing from BBL®MGIT™ Mycobacteria Growth Indicator Tubes containing *M.tuberculosis*.Poster N°C158,95th General Meeting of the American Society for Microbiology,1995, Washington,D.C., USA.

147.-Kodsí S.E.,Hagemann P.A.,Douglass J.P.,Stitt D.T.*Mycobacterium tuberculosis* Susceptibility Testing to Isoniazid and Rifampin using the BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tube.Abstracts N°652. 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases , 1995,Vienna,Austria.

148.-Walters S.B. and Hanna B.A.Testing of susceptibility of *M.tuberculosis* to isoniazid and rifampin by mycobacterium growth indicator tube method.J.Clin.Microbiol.1996;34:1565-1567.

149.-Hagemann P.A.,S.E.Kodsí,J.P.Douglass,D.T.Stitt.Preliminary Methods for Streptomycin and Ethambutol Susceptibility Testing from BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tube containing *M.tuberculosis*.Poster N°U65. 95th General Meeting of American Society for Microbiology,1995, Washintong,D.C., USA.

150.-Costa D.,Mandler F.,Passerini Tosi C.,Penati,Piersimoni C. et al.Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube(MGIT).A New Rapid Non-Radiometric Method in Mycobacteria Diagnosis.Abtr.B1.16th Annual Meeting European Society of Microbiology, 1995,Pisa,Italy.

151.-Reisner B.S.,Gatson A.M.,and Gail L.Woods G.L.Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* to Isoniazid and Rifampin.Diag. Microbiol. Infect Dis.1995;22:325-329.

152.-Douglass J.P.,P.A.Hagemann,S.E.Kodsí,D.T.Stitt. A Method to Perform BACTEC®460 TB System Suceptibility Testing from the BBL® MGIT™ Mycobacteria Growth Indicator Tube containing *M.tuberculosis*.Poster N°U64. 95th General Meeting of the American Society of Microbiology, 1995, Washington,DC.,USA.

153.-Hagemann P.A., Kodsí S.E.,Douglass J.D.,Stitt D.T.A Method for Performing streptomycin and ethambutol susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using the BBL®Mycobacteria Indicator Tube.Abstract N°U-76. 96th General Meeting of the American Society for Microbiology,1996,New Orleans, USA.

154.- Palaci M., Yoko Mizuca Ueki S., Nakamura Sato D.,da Silva Telles Mª.A.,Curcio M.,and Matheus Silva E.A..Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube for Recovery and Drug Suceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Respiratory Specimens.J. Clin. Microbiol., 1996,34(3):762-764.

155.-Kodsi S.E., Sturm K.M., and Stitt D.T. Use of BBL® MGIT tubes to determine MICs of *M.tuberculosis* strains. Program N°1080, page 22. 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1997, Lausanne, Switzerland.

156.-Van Eldere J., Moons V., Standaert K., Verbist L. Evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube for Drug Susceptibility Testing of *M.tuberculosis*. Program N°1083. 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1997, Lausanne, Switzerland.

157.-Welscher H.M., Kissling P., and Pfyffer G.E. Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* Using the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT AST SIRE System). Program N°1082. 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1997 Lausanne, Switzerland.

158.-Nardi G., Gismondo M.R., Frisenda L., Polato R. Validation of a new Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) Drug Susceptibility System on *M.tuberculosis* Strains. Program N°1084. 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1997, Lausanne, Switzerland.

159.-Bergmann J.S and Woods G.L. Evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) for Susceptibility Testing of *M.tuberculosis* (MTB). J.Clin. Microbiol. 1997, 35(12):3325-3327.

160.-Abu-Lawi K.I., Razeq J.H., Clarke K.G., Goldberg R., Gullans C.R., Sierra M. F., Hanna B.A. Walters, S.B. *M.tuberculosis*: Susceptibility to Isoniazid (INH) and Rifampin (RIF) Using the BBL-Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT). Abstract N°U58. American Society of Microbiology General Meeting, 1997, New Orleans, USA.

161.-Noordhoek G.T., Van Emden J.D.A., AH Kolk. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. J.Clin. Microbiol. 1996; 34:2522-2525.

162.-Hass D.W. Current and future applications of polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis*. Mayo Clin. Proc. 1996; 71:311-313.

163.-Dalovisio J.R., Montenegro-James S., Kemmerly S.A. et al. Comparison of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) direct test, Amplicor MTB PCR, and IS6110 for detection of MTB in respiratory specimens. Clin. Infec. Dis. 1996; 23:1099-1106.

164.-Down J.A., O'Connell P., Dey M.S. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens by strand displacement of DNA. J.Clin. Microbiol. 1996; 34:860-865.



- 165.-Eisenstein,B.The polymerase chain reaction.A new method of using molecular genetics for medical diagnosis.N.Engl.J.Med. 1990;322:178-183.
- 166.-Reisner B.S., Gatson A.M. and Woods G.L.Use of Gen-Probe Accuprobes to identify *Mycobacterium avium complex*,*M.tuberculosis complex*,and *M.gordonae* directly from BACTEC® TB broth cultures.J.Clin.Microbiol.1994,32:2995-2998.
- 167.-Musial C.E.,Tice L.S., Stockman L., and Roberts G.D.Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe Rapid Diagnostic System for *Mycobacterium avium complex* and *Mycobacterium tuberculosis complex*. J.Clin.Microbiol.1988;26:2120-2123.
- 168.-Ichiyama S.,Iinuma Y.,Yamori S.,Hasegawa Y.,Shimokata,and Nakashima N.Mycobacterium Growth Indicator Tube Testing in conjunction with the Accuprobe or the Amplicor-PCR assay for detecting and identifying Mycobacteria from sputum samples.J.Clin.Microbiol.1997,35(8):2022-2025.
- 169.-Aznar J.,Safi H.,Romero J.,Alejo A.,Gracia A.,Palomares J.C.Nosocomial transmission of tuberculosis infection in pediatrics wards.Pediatr.Infect.Dis.1995;14:44-48.
- 170.-Yang Z.,Chaves F.,Barnes P.F. et al.Evaluation of method for secondary DNA typing of *Mycobacterium tuberculosis* with pTBN12 in epidemiologic study of tuberculosis.J.Clin.Microbiol.1996;34:3044-3048.
- 171.-Musser J.M.,Antimicrobial agent resistance in Mycobacteria:Molecular genetic insights.Clin.Microbiol.Rev.1995;8:496-514.
- 172.-Rossau,R.,Jannes,G.,Mijs,W.,Van Asbroeck,M.,De Beenhouwer,H.,and Portaels F.Fast and convenient detection of antimicrobial resistance markers in clinical samples using PCR and the line probe assay(INNO-LiPA).Innogenetics N.V., Ghent, Belgium.Inst.Tropical Medicine,Antwerp,Belgium.In Abstract of the 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases , 1995, Vienna, Austria.
- 173.-Portaels,F.,Schel,P.,De Rijk,P.,Mijs,W.,Van Asbroeck,M.,Rossau,R.The LINE PROBE assay(INNO-LiPA) for the rapid identification of mycobacteria species.Institute of Tropical Medicine,Division of Microbiology, Antwerp, Belgium.Innogenetics N.V.,Ghent,Belgium.In Abstracts of the 16th Annual Meeting,European Society for Mycobacterology,1995,Pisa,Italy.
- 174.-González N.,Torres M.J.,Aznar J.,Palomares J.C.Characterization of Mutations in the rpoB gen in Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains.Poster N°1091. 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ,Lausanne, Switzerland,May 1997.

- 175.-Cooksey R.C.,Morlock G.P.,Glickman S.,and Crawford J.T.Evaluation of a Line Probe Assay of *rpoB* Mutations in Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from New York City.J.Clin. Microbiol.,1997,35(5):1281-1283.
- 176.-Kubica G.P.,Dye W.E.,Cohn M.L.,and Middlebrook G.Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria.Amer.Rev.Resp.Dis.1963;87:775-779.
- 177.-Kent,P.T. et al.The sputum digestion process in mycobacteriology: Centrifugal efficiency and digestant toxicity.Abstract N°U2,American Society of Microbiology Annual Meeting,1986,St.Louis, USA.
- 178.-American Lung Association.Diagnostic standards and classification of tuberculosis and other mycobacterial diseases.New York.1974.
- 179.-Manual of Diagnostic and Public Health Mycobacteriology.Prepare for the European Society for Mycobacteriology by an ad hoc committee. 1991,London,England.
- 180.-Cohn M.L.,Waggoner R.F.,and McClatchy.The 7H11 medium for the cultivation of Mycobacteria. Am.Rev.Resp.Dis.1968;98:295-296.
- 181.-Youmans G.P.Cultivation of mycobacteria,the morphology and metabolism of mycobacteria,p.25-35.Tuberculosis.1979.W.B.Saunders Company,Philadelphia.
- 182.-Isenberg H.D.Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM.1992 , Washington D.C.
- 183.-Procedures for the isolation and identification of Mycobacteria. U.S.Department of Health,Education and Welfare.1975.
- 184.-Medical Section of American Lung Association.Pruebas diagnósticas rápidas para la tuberculosis;Cuál es su uso apropiado?.Ameri. J. Resp. Critical Care Med.,vol.155:1-9. 1997.
- 186.-Forbes B.A. and Hicks K.E.Ability of PCR assay to identify *M.tuberculosis* in BACTEC® 12B vials.J.Clin.Microbiol..1994,32(7):1725-1728.
- 187.-Perfecto B.,Dorransoro I.,López-Goñi I.Tipificación de Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* por RFLP.SCO-02 2. VII Reunión del Grupo Español de Micobacteriología ,1996,Zaragoza,España.
- 188-Telenti,A.,Imboden,P.,Marchesi,F.,et al.Detection of rifampicine-resitance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet,1993;341:647-650.

- 189.-Telenti,A.,Imboden,P.Marchesi,F.et al.Direct,automated detection of Rifampicine-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis.Antimicrob Agents Chemother,1993;37:2054-2058.
- 190.-Williams,D.L.,Waguespack C.,Eisenach K.,et al.Characterization of rifampicin resistance in pathogenic mycobacteria.Antimicrob Agents Chemother,1994;38:2380-2386.
- 191.-Kusunoki S.,Ezaki T.,Tamesada M.,Katanaka Y.,Asano K. et al.Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium species*.J.Clin.Microbiol.1991;29:1596-1603.
- 192.-McFadden J., Kunze Z.,and Seechurn P.DNA probes for detection and identification,p.139-172.IN Molecular biology of the mycobacteria.Academic Press,1990.San Diego.
- 193.-Lim S.,Tood J.,López J.,Ford E., and Janda J.M.Genotypic identification of pathogenic *Mycobacterium species* by using a nonradiative oligonucleotide probe.J.Clin.Microbiol.1991;29:1276-1278.
- 194.-Clark-Curtiss,J.Genome structure of mycobacteria,p.77-96.In J.McFadden( ) , Molecular biology of the mycobacteria.Academic Press,1990,San Diego.
- 195.-Kapur,V.,Li,L.,Iordanescu,S.,et al.Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gen(rpoB) encoding the RNA polymerase B subunit in rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. J.Clin.Microbiol.1994;32:1095-1098.
- 196.-Starke J.Childhood tuberculosis.A Diagnostic Dilema.Chest 1993;104(2):329-30.
- 197.-Roberts G.D.,Goodmann N.L.,Heifets L.,Larsh H.W.,Lindner T.H. et al.Evaluation of BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. J.Clin.Microbiol. 1983;18:689-696.
- 198.-Good,R.C. et al.Reproductibility of drug suceptibility test with *M.tuberculosis*.Abstract U5,American Society of Microbiology Annual Meeting, 1984, St Louis, USA.
- 199.-Siddiqi S.H.,Hankins J.E.,Laszlo A.,et al.Interlaboratory drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by radiometric and two conventional methods. J.Clin. Microbiol. ,1985;22:919-923.

- 200.-Siddiqi,S.H. et al.Determination of minimal inhibitory concentrations(MICs) of antituberculosis drugs for *Mycobacterium tuberculosis* using radiometric and agar dilution methods.Abstract 1201,I.C.A.A.C. Annual Meeting 1984,Washington,DC. USA.
- 201.-Middlebrook,G. et al.Bacteriology of tuberculosis:Laboratory methods . Am.J.Publ.Health,1958;48:844-853.
- 204.-Snider,Jr.,D.E. et al .Rapid drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Am.Rev.Respir.Dis.1981;123:402-406.
- 205.-Vestel,A.L..Procedures for isolation and identification of mycobacteria.Center for Disease Control(DHEW)Publication No.(CDC)1975;76-8230.
- 205.-Heifets,L.B.et al.MIC as a quantitative measurement of the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* strains to seven antituberculosis drugs.Antimicrob. Agents & Chemotherapy,1988;32:1131-1136.
- 207.-Heifets,L.B. Drug Susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infection. p.107-108.CRC Press,Inc.,1991,Boca Raton,FL.
- 208.-Libonati,J.P.et al.Comparison of INH concentrations for susceptibility testing of *M.tuberculosis* by the radiometric and conventional methods.Abstract 1215,ICAAC Annual Meeting,1988,Los Angeles,CA.
- 209.-Lee,C.and Heifets,L.B.Determination of minimal inhibitory concentrations of antituberculosis drugs by radiometric and conventional methods. Am.Rev.Resp.Dis., 1987;36:349.
- 210.-Siddiqi,S.H.et al.Rapid Broth macrodilution method for determination of MICs for *Mycobacterium avium* isolates. J.Clin.Microbiol.,1993;31:2332-2338.
- 211.-Canetti,G.,Froman,S.,Grosset,J.,Hauduroy,P.,Miroslava,L. Mycobacteria:Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance.Bull.WHO,1963;29:565-568.
- 212.-Canetti,G.,Rist,N.,Grosset,J.Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la methodé des proportions: methodologie,critéries de résistance mutants,interpretation.Rev de la Tub et Pneumol,1963;27:218.
- 213-McClatchy,J.K. Antituberculosis drugs:mechanisms of action,drug resistance,susceptibility testing and assays of activity in biological fluids. In:Lorian V.(ed) .Antibiotics in laboratory medicine.Second edition.Baltimore:Williams and Wilkins, 1986;181-222.

- 214.-Canetti,G.,Fox,W.Khomenko, et al.Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programs.Bull WHO, 1969;41:21-43.
- 215.-Kochi,A.,Vareldzis,K.Multidrug-resistant tuberculosis and its control.Res Microbiol.1993.
- 216.-Williams L.,Fehd R.,Handsfield J.,Cook C.,Ridderhof J.Laboratory Practices for M.tuberculosis(MTB) Drug Susceptibility Testing in the U.S.Program N° U77. 97th American Society of Microbiology General Meeting, New Orleans,Loussiana.USA.
- 217.-Humphries J.,Stone P.,and Sulton P.An Evaluation of Mycobacterial Culture Methods.Program N° U148.97th American Society of Microbiology General Meeting, New Orleans,Loussiana.USA.
- 218.-Park C.H.Identification of *M.tuberculosis complex* Directly from Clinical Specimens using Mycobacteria Growth Indicator Tube(MGIT™)Containing NAP Compuond.Programe N° U151. 97th American Society of Microbiology General Meeting, New Orleans,Loussiana.USA.
- 219.-Kodsi S.E.,Sturm K.M. and Stitt D.T.Nutritional Requeriments of Mycobacteria in MGIT™ Tubes.Program N°U153. 97th American Society of Microbiology General Meeting, New Orleans,Loussiana.USA.
- 220.-Walters S.B.,Yu K.K.,Bonk B.J.,Hanna B.A..Pyrazinamide Testing of M.tuberculosis by the MGIT™.Abstract N°U59. 96th American Society of Microbiology General Meeting,1996,New Orleans,Loussiana.USA.
- 221.-Ruiz P.,Gutiérrez J.,Zerolo F.J.,López J.,Martinez C.,y Casal M.Estudio de las resistencias a *M.tuberculosis* en el Centro de Referencia de Micobacterias de Córdoba.II Congreso de la Sociedad Española de Quimioterápia.Córdoba,Octubre 1994.Pg:233-34.
- 222.-Pfyffer G.E.,Welscher Hans-Martin,and Kissling P.Pretreatment of Clinical Specimens with Sodium Dodecyl(Lauril) Sulfate Is Not Suitable for the Mycobacteria Growth Indicator Tube Cultivation Method.J.Clin.Microbiol., 1997 ,35(8):2142-2144.
- 223.-Casal Roman Manuel.Sistemas de Estudio de Sensibilidad a Antimicrobianos. Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología Clínicas(SAMPAC).1992.
- 224.-Cornfield D.B.,Beavis K.G.,Greene J.,Bojak M.A.,Bondin J.M.Acid-fast (AFB) Growth and Bacterial Contamination in the MGIT™ and Bactec® 460. Abstract N°C6. 96th American Society of Microbiology General Meeting ,1996,New Orleans, Loussiana.USA.

- 225.-Casal Román M.Laboratory Approaches to Mycobacterial Susceptibility to Antibiotics.Rev.Esp.Quimioterap.,Septiembre 1995; 8(3):184-189.
- 226.-Shawar R.M,Humble D.J.,Van Dalfsen J.M.,Stover C.K.,Hickey M.J. et al.Rapid screening of natural products for antimycobacterial activity by using luciferase-expressing strains of *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium intracellulare*.Antimicrob.Agents Chemother.1997.41:570-574.
- 227.-Inderlied C.B.,Nash K.A.Antimycobacterial Agents:In Vitro Susceptibility Testing,Spectra of Activity,Mechanisms of Action and Resistance and Assays for Activity in Biologics Fluids.p:127-175.In:Antibiotics in Laboratory Medicine.Ed. V.Lorian,4th Edition. Williams and Wilkins.1996.
- 228.-Sommmers H.M.,McClatchy J.K.Laboratory Diagnosis of the mycobacterioses. In:Morello J.A.,(ed) Cumitech 16.Washington,D.C.:A.S.M.,1983.
- 229.-Collins C.H.,Uttley A.H.In vitro susceptibility of mycobacteria to ciprofloxacin. J.Antimicrob.Chemomether,1985;16:575-80.
- 230.-Gay J.D.,DeYoung D.R.,Roberts G.D.In vitro activities of norfloxacin and ciprofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*,*M.avium complex* ,*M.chelonae*, *M.fortuitum*, and *M.kansasii*. Antimicrob.Agents Chemother 1984;26:94-6.
- 231.-Cynamon M.H.Comparative in vitro activities of MDL 473,rifampin, and ansamycin against *Mycobacterium intracellulare*.Antimicrob Agents Chemother 1985;28:440-1.
- 232.-Heifets L.B.,Iseman M.D.,Lindholm-Levy P.J.Ethambutol MICs and MCBs for *M.avium complex* and *M.tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother 1986;30:927-32.
- 233.- Heifets L.B.,Iseman M.D.,Lindholm-Levy P.J,Kanes W.Determination for ansamycin minimal inhibitory concentrations for *M.avium complex* in liquid medium by radiometric and conventional methods.Antimicrob. Agents Chemoter 1985;28:570-5.
- 234.-Heifets L.B.,Iseman M.D.,Cook J.L.,Lindholm-Levy P.J.,Drupa I. Determination of in vitro susceptibility of *M.tuberculosis* to cephalosporins by radiometric and convetional methods.Antimicrob.Agents Chemother 1985;27:11-5.
- 235.- Heifets L.B.,Lindholm-Levy P.J.Bacteriostatics and bactericidal activities of ciprofloxacin and ofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium complex*.Tubercle 1987;68:267-76.
- 236.- Swenson J.M.,Thornsberry C.,Silcox V.A.Rapidly growing mycobacteria:testing of susceptibility to 34 antimicrobial agents by broth microdilution.Antimicrob.Agents Chemother 1982;22:186-92.

- 237.-Wallace R.J.,Nash D.R.,Steele L.C.,Steigrube V.Susceptibility testing of slowly growing mycobacteria by a microdilution MIC method with 7H9 broth.J.Clin. Microbiol.1986;24:976-81.
- 238.-David H.L.Bacteriology of micobacterioses.Washington,DC:U.S.Government Printing Office,1976;DHEW Publication No.(CDC) 76-8316.
- 239.-McClatchy J.K.Susceptibility testing of mycobacteria.Lab.Med.1978;9:47-52.
- 240.-David H.L. Bacteriology of mycobacterioses.Washington DC:United States Government Printing Office,1976:166.
- 241.-David H.L.Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis* .Appl.Microbiol.1970.20:810-814.
- 242.-Norris S.,Nightingale C.H.,Mandell G.L.L.,Tables of antimicrobial agent pharmacology.In:Mandell GL,Douglas RG Jr.,Bennett JE,eds.Principles and practices of infectiuos diseases.New York:Churchill Livingstone,1990.
- 243.-Max Salfinger M.D.Role of the Laboratory in Evaluating Patients with Mycobacterial Disease.Clinical Microbiology Newsletter 1995,17:14.
- 244.-Stone B.L.,Burman W.J.,Hildred M.V.,Jarboe E.A.,Reves R.R.,and Wilson M.L.The Diagnostic Yield of Acid Fast Bacillus Smear Positive Sputum specimens.J.Clin.Microbiol.,1997,35(4):1030-1031.
- 245.-Styrt B.A.,Shinnick T.M.,Ridderhof J.C.,Crawford J.T.,and Tenover F.C. Turnaround Times for Mycobacterial Cultures.J.Clin. Microbiol.,1997,35(4):1041-1042.
- 246.-Shinnick T. and Good R.C.Diagnostic mycobacteriology Laboratory Practices. Clinical Infectious Diseases,1995;21:291-9.
- 247.-Tokars J.I.,Rudnick J.R.,Kroc K.,Manangan L.,Pugliese G.,Huebner R.E.,Chan J.,and Jarvis W.R.U.S.Hospital Mycobacteriology Laboratories:Status and Comparison with State Public Health Care Departament Laboratories.J.Clin. Microbiol.,1996,34(3):680-685.
- 248.-Bird B.R.,Denniston M.M.,Huebner R.E.,and Good R.C.Changing Practices in Mycobacteriology:a Follow-Up Survey of State and Territorial Public Health Laboratories.J.Clin.Microbiol.,1996,34(3):554-559.
- 249.-Laszlo A.,Rahman M.,Raviglione M.,Bustrec F.Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Laboratory Network:firts round of proficiency testing.Int. J. Tuberc. Lung Dis.,1997,1(3):231-8.

250.-Boom R.,Sol C.J.A.,Salimans M.M.M.,et al."Rapid and simple method for purification of nucleic acids".J.Clin.Microbiol.1990.28:495-503.



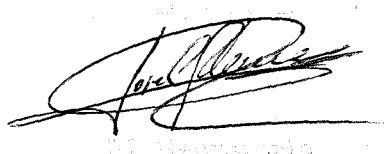
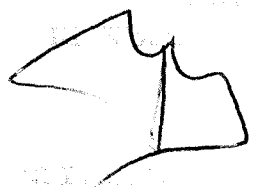
Escuela de Ingeniería en Alimentos y Nutrición  
Cátedra de Tecnología de Alimentos

Tabla Zapata Moisés

Mediación del nuevo sistema posib<sup>to</sup> para el cuidado  
de la salud pública, en materia de alimentación y  
nutrición de la comunidad.

Especially with honor

del 20 de Mayo de 1999



El Decano,  
Dr. Víctor

