



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología**

**Evaluación de Genotype Mycobacterium Direct,
nueva técnica genética de microbiología molecular
en la detección de *M. tuberculosis Complex* y otras
micobacterias atípicas en muestras de interés clínico.**

Francisco Franco Álvarez de Luna

Tesis presentada para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Córdoba

Córdoba 2007

TITULO: *EVALUACIÓN DE GENOTYPE MYCOBACTERIUM DIRECT, NUEVA
TECNICA GENÉTICA DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR EN LA
DETECCION DE M. TUBERCULOSIS COMPLEX Y OTRAS
MICOBACTERIAS ATÍPICAS EN MUESTRAS DE INTERÉS CLÍNICO*

AUTOR: *FRANCISCO FRANCO ÁLVAREZ DE LUNA*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

DR. MANUEL CASAL ROMÁN, CATEDRÁTICO DE
MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

HACE CONSTAR:

Que la Tesis para optar al grado de Doctor y que lleva por título: **“Evaluación de *Genotype Mycobacterium Direct*, nueva técnica genética de microbiología molecular en la detección de *M. tuberculosis Complex* y otras micobacterias atípicas en muestras de interés clínico.”**, ha sido realizada por el Licenciado D. Francisco Franco Álvarez de Luna, en la Cátedra de Microbiología de la Universidad de Córdoba, bajo mi dirección, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste donde convenga al interesado, firmo la presente en Córdoba, a 24 de enero de 2007.

Fdo: Prof. Dr. Manuel Casal Román.
Catedrático de Microbiología.

Dra. PILAR RUIZ MARTÍNEZ, PROFESORA TITULAR DE
MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

HACE CONSTAR:

Que la Tesis para optar al grado de Doctor y que lleva por título: “**Evaluación de *Genotype Mycobacterium Direct*, nueva técnica genética de microbiología molecular en la detección de *M. tuberculosis Complex* y otras micobacterias atípicas en muestras de interés clínico.**”, ha sido realizada por el Licenciado D. Francisco Franco Álvarez de Luna, en la Cátedra de Microbiología de la Universidad de Córdoba, bajo mi dirección, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación

Y para que conste donde convenga al interesado, firmo la presente en Córdoba, a 24 de enero de 2007.

Fdo: Dra. Pilar Ruiz Martínez.
Profesora Titular de Microbiología.

A mis padres y abuelos

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me han ayudado a hacer realidad este trabajo. A todas ellas y los que se olvidan, muchas gracias:

Al Prof. Manuel Casal, que me dio la oportunidad de realizar este trabajo y puso todos los medios a mi disposición. Por su apoyo y ayuda incondicional durante estos años.

A la Dra. Pilar Ruiz, por todo lo que me ha enseñado en el laboratorio de micobacterias, y los ánimos dados en todo momento.

Al Prof. Manuel Vaquero, por su gran ayuda en la realización del tratamiento estadístico de los resultados presentados en este trabajo.

Al Dr. Fernando Rodríguez, además de mi jefe y compañero, un amigo que tanto me ha aconsejado y ayudado estos años.

Al Dr. Juan Gutiérrez, que tanto me ha aconsejado, que debía realizar la tesis, además ayudarme y apoyarme en todo momento estos años.

Al Dr. José Antonio Lepe, que me ha enseñado *más* microbiología, que me ha aconsejado como un amigo y me ha apoyado en momentos difíciles.

A mis padres, por que sin su esfuerzo y ayuda esto no hubiera sido posible, porque siempre han confiado en mí y me ha apoyado en todo.

A María Jesús por su ánimo, comprensión y apoyo en todo momento. Por su confianza, amistad y todo lo demás, estos años.

A mis residentes, compañeros y amigos, en el Laboratorio de Microbiología, Rocío, M^a José, Rafa, Ángel, Manu y Carmen. Por los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A Manuel Orugo, por creer y confiar en el Laboratorio de Microbiología, por su amistad, sus consejos, y por los buenos momentos profesionales y ociosos.

A todo el personal facultativo, enfermería, TEL y secretarías del Servicio de Microbiología del Hospital U. Reina Sofía y al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina.

A todos los residentes y amigos que me han acompañado estos años en Córdoba, que tanto hemos disfrutado y.... trabajado.

A todos mis amigos y familia, allí donde estén, a todos aquellos que han hecho posible este trabajo y han estado a mi lado estos años.

Parte de los resultados y de la investigación realizadas en este trabajo han sido publicados y presentados en congresos:

- ❖ Franco-Álvarez de Luna, F., Ruiz, P., Gutiérrez, J. and Casal, M.
Evaluation of GENOTYPE MYCOBACTERIA DIRECT for detection of *M. tuberculosis Complex* and four atypical mycobacteria in clinical samples. Journal of Clinical Microbiology 2006; 44(8): 3025-27.

- ❖ Franco-Álvarez de Luna, F., Ruiz, P., Gutiérrez, J. y Casal, M.
Comparación entre GENOTYPE MYCOBACTERIA DIRECT® y COBAS AMPLICOR MTB® en la detección de *M. tuberculosis Complex* en muestras clínicas. XII Reunión del Grupo Español de Micobacteriología (GEM). Pamplona 2006.

- ❖ Franco-Álvarez de Luna, F., García AD., Ruiz, P., Gutiérrez, J. y Casal, M.
GENOTYPE MYCOBACTERIA DIRECT®, nueva técnica de microbiología molecular para la detección de *M. tuberculosis Complex* y otras micobacterias atípicas en muestras clínicas. XII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Valencia 2006.

- ❖ Franco-Álvarez de Luna, F., Ruiz, P., Gutiérrez, J.B. y Casal, M.
GENOTYPE MYCOBACTERIA DIRECT® en la detección de *M. tuberculosis Complex* y cuatro micobacterias atípicas en muestras clínicas respiratorias y extrapulmonares. XIX Reunión de la Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología, SAMPAC. Córdoba 2006.

1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex.....	16
1.2. <i>Mycobacterium avium</i> Complex (MAC).....	18
1.3. <i>Mycobacterium kansasii</i>	19
1.4. <i>Mycobacterium malmoense</i>	20
1.5. Evolución histórica de la tuberculosis	21
1.6. Evolución de las técnicas del laboratorio de Microbiología en el diagnóstico de la tuberculosis.....	25
1.7. Métodos Moleculares para la detección de <i>M. tuberculosis</i> Complex y micobacterias atípicas en en muestras clínicas.....	28
1.7.1. COBAS AMPLICOR <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Test® (F. Hoffman-La Roche Ltd. Basel, Switzerland).....	28
1.7.2. AMTD2 (Amplified <i>M. tuberculosis</i> Direct Assay) ® (GenProbe, San Diego. CA)	30
1.7.3. BDProbeTEC ET® (Becton Dickinson)	31
1.7.4. INNO-LiPA RIF.TB line probe assay.....	33
1.7.5. RealArt <i>M. tuberculosis</i> TM PCR Kit.....	33
1.7.6. Sistemas de detección caseros.	34
1.7.7. Genotype <i>Mycobacteria</i> Direct (GTMD) (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany).	34
2. OBJETIVOS	42
3. MATERIAL	44
3.1. Descripción de la muestra de estudio.	44
3.2. Muestras Clínicas.....	46
3.3. Muestras Control y cepas ATCC.....	54
3.4. Medios de cultivo y Composición química.	55
3.5. Productos Químicos y Biológicos.....	55
3.6. Material Fungible y de Laboratorio.....	56
3.7. Genotype <i>Mycobacteria</i> Direct®.	57
3.8. Cobas Amplicor-MTB®.	60
3.9. Auto-LiPA Profiblot TECAN®.....	61
4. MÉTODO	63
4.1. Procesamiento de las muestras clínicas.....	63
4.1.1. Descontaminación	63

4.1.2.	<i>Tinciones</i>	65
4.1.3.	<i>Cultivo e incubación</i>	68
4.2.	<i>Identificación de los aislamientos</i>	68
4.2.1	<i>AccuProbe (Gen-Probe, Inc., San Diego, California)</i>	69
4.2.2	<i>Genotype CM Assay (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany).</i> 71	
4.3.	<i>Genotype Mycobacteria Direct. (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany)</i>	75
4.4.	<i>Genotype Mycobacteria Direct VER 3.0 (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany)</i>	89
4.5.	<i>COBAS AMPLICOR MTB Assay. (F. Hoffman-La Roche Ltd. Basel, Switzerland)</i>	93
5.	RESULTADOS	99
5.1.	<i>Características de los pacientes incluidos en el estudio.</i>	99
5.2.	<i>Procedencia y caracterización de las muestras incluidas en el estudio.</i> 101	
5.3.	<i>Relación entre Enfermedad y Resultados de: baciloscopia, cultivo, PCR y GTMD en muestras totales. Concordancia Clínica.</i>	104
5.4.	<i>Relación entre GTMD y los resultados de: baciloscopia, cultivo y PCR en muestras totales. Concordancia clínica.</i>	105
5.5.	<i>Parámetros de validez de los test ensayados.</i>	106
5.5.1.	<i>Genotype Mycobacteria Direct y Cobas Amplicor-MTB en muestras totales.</i>	106
5.5.2.	<i>Genotype Mycobacteria Direct y Cobas Amplicor-MTB en muestras de localización pulmonar.</i>	107
5.5.3.	<i>Genotype Mycobacteria Direct y Cobas Amplicor-MTB en muestras de localización extrapulmonar.</i>	108
5.5.4.	<i>Genotype Mycobacteria Direct y Cobas Amplicor-MTB en la detección de M. tuberculosis Complex.</i>	109
5.5.5.	<i>Genotype Mycobacteria Direct en la detección de micobacterias atípicas.</i> 110	
5.5.6.	<i>Genotype Mycobacteria Direct y Cobas Amplicor-MTB muestras con microscopía positiva.</i>	111
5.5.7.	<i>Genotype Mycobacteria Direct y Cobas Amplicor-MTB en muestras con microscopía negativa.</i>	112
5.5.8.	<i>Genotype Mycobacteria Direct tras el Análisis de las discrepancias de los resultados.</i>	113
5.5.9.	<i>Baciloscopia y Cultivo tras el Análisis de las discrepancias en los resultados.</i>	115

5.6.	<i>Límites de detección de ARNr de M. tuberculosis Complex mediante GTMD.</i>	116
5.8.	<i>Visualización de resultados de Genotype Mycobacteria Direct.</i>	117
5.9.	<i>Genotype Mycobacteria Direct en la detección de infecciones mixtas.</i>	118
6.	DISCUSIÓN	121
6.1.	<i>Genotype Mycobacteria Direct en la detección de M. tuberculosis Complex y cuatro micobacterias atípicas. Diferentes aspectos.</i>	133
6.1.1	<i>GTMD en muestras respiratorias y extrapulmonares.</i>	133
6.1.2	<i>GTMD en muestras con microscopía positiva y negativa.</i>	134
6.1.3	<i>GTMD en muestras de pacientes en tratamiento antituberculoso.</i>	135
6.1.4	<i>Incorporación de GTMD al flujo de trabajo en los laboratorios de microbiología.</i>	136
7.	CONCLUSIONES	138
8.	BIBLIOGRAFÍA	140

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de las muestras clínicas por paciente.	46
Tabla 2. Muestras clínicas respiratorias.....	53
Tabla 3. Muestras clínicas extrapulmonares.....	53
Tabla 4. Cepas Control de Micobacterias.	54
Tabla 5. Muestras Control.....	54
Tabla 6. Reactivos utilizados en Genotype Mycobacteria Direct.	58
Tabla 7. Reactivos utilizados en Genotype Mycobacteria Direct Versión 3.0. .	59
Tabla 8. Reactivos utilizados en Cobas Amplicor MTB.....	60
Tabla 9. Especies de micobacterias que identifica Genotype CM/AS Assay. ...	71
Tabla 10. Programación del termociclador en Genotype CM Assay.....	73
Tabla 11. Simulación para la determinación del tamaño muestral.....	44
Tabla 12. Procedencia por Servicios y Hospitales, de las muestras procesadas en el laboratorio.	45
Tabla 13. Muestras clínicas respiratorias y extrapulmonares totales.....	101
Tabla 14. Distribución de las muestras clínicas con microscopía positiva.	102
Tabla 15. Distribución de las muestras clínicas con cultivo positivo.	102
Tabla 16. Distribución de las muestras clínicas con GTMD positivo.....	103
Tabla 17. Distribución de las muestras clínicas con PCR positiva.....	103
Tabla 18. Relación estadística y concordancia clínica entre Enfermedad y las variables del estudio.	104
Tabla 19. Relación estadística y concordancia clínica entre Genotype Mycobacteria Direct y las variables del estudio.....	105
Tabla 20. Parámetros de validez entre GTMD y PCR-MTB frente al cultivo de micobacterias en muestras totales.....	106
Tabla 21. Parámetros de validez entre GTMD y PCR-MTB frente al cultivo de micobacterias en muestras de localización pulmonar.	107
Tabla 22. Parámetros de validez entre GTMD y PCR-MTB frente al cultivo de micobacterias en muestras de localización extrapulmonar.	108
Tabla 23. Parámetros de validez entre GTMD y PCR-MTB frente al cultivo de micobacterias en la detección de M. tuberculosis Complex.....	109
Tabla 24. Parámetros de validez entre GTMD frente al cultivo en la detección de micobacterias atípicas.....	110
Tabla 25. Parámetros de validez entre GTMD y PCR-MTB frente al cultivo de micobacterias en muestras con baciloscopia positiva.....	111

Tabla 26. Parámetros de validez entre GTMD y PCR-MTB frente al cultivo de micobacterias en muestras con baciloscopia negativa.	112
Tabla 27. Parámetros de validez entre GTMD y PCR-MTB frente a criterios de enfermedad clínica en muestras totales.....	113
Tabla 28. Muestras con resultados discordantes entre GTMD y cultivo-enfermedad.	114
Tabla 29. Parámetros de validez entre la baciloscopia y el cultivo frente a criterios de enfermedad clínica en muestras totales.	115
Tabla 30. Sensibilidad de GTMD en muestras con concentraciones de M. tuberculosis Complex conocidas.....	116
Tabla 31. Cepas ATCC de micobacterias empleadas en la validación de Genotype Mycobacteria Direct.	118
Tabla 32. Muestras control empleadas para la detección de infecciones mixtas mediante Genotype Mycobacteria Direct.	118
Tabla 33. Principales características de las diferentes técnicas de microbiología molecular para la detección de M. tuberculosis Complex y micobacterias atípicas directamente de la muestra clínica.	127
Tabla 34. Evaluación de AMPLICOR (PCR) en la detección de M. tuberculosis Complex en muestras clínicas.	128
Tabla 35. Evaluación de AMTD2 en la detección de M. tuberculosis Complex en muestras clínicas.....	129
Tabla 36. Evaluación de BD Probe Tec en la detección de M. tuberculosis Complex en muestras clínicas.	130
Tabla 37. Evaluación de LCx en la detección de M. tuberculosis Complex en muestras clínicas.	131
Tabla 38. Estudios comparativos de las diferentes técnicas moleculares, en la detección de M. tuberculosis Complex.....	132

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de la reacción NASBA en GTMD.....	38
Figura 2. Modelo de detección mediante Hibridación Reversa sobre tira nitrocelulosa.....	39
Figura 3. Esquema de las sondas presentes en la membrana de detección de GTMD.....	40
Figura 4. Plantilla para la interpretación de los resultados en GTMD.....	40
Figura 5. Tira de nitrocelulosa en Genotype CM Assay.	73
Figura 6. Diagrama para la interpretación de los resultados en Genotype CM Assay.	74
Figura 7. Formulario de evaluación de GTMD.....	86

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Tinción de auramina-rodamina positiva.	66
Imagen 2. Tinción de Ziehl-Neelsen positiva.	67
Imagen 3. Lector de la sonda AccuProbe, “Leader 50-i”.	70
Imagen 4. Diagrama del flujo de trabajo en la realización de la sonda MTB mediante sonda AccuProbe.	70
Imagen 5. Separador magnético en el proceso de extracción del RNA.....	82
Imagen 6. Liofilizado de la mezcla de enzimas de amplificación reconstituido.	83
Imagen 7. Tubo de amplificación con y sin enzimas de amplificación.	84
Imagen 8. TwinCubator® con bloque de amplificación.....	84
Imagen 9. Profiblot-Tecan®, disposición de reactivos.	85
Imagen 10. TwinCubator® con bloque de detección.	86
Imagen 11. Interpretación de resultados en el formulario tras finalizar GTMD.	87
Imagen 12. Analizador Cobas Amplicor.....	95
Imagen 13. Anillo de muestras para amplificación y detección en Cobas Amplicor	96
Imagen 14. Evaluación de resultados en Amplicor-MTB.	97
Imagen 15. Resultados obtenidos mediante GTMD, en muestras clínicas, durante el estudio.....	117
Imagen 16. Genotype Mycobacteria Direct en la detección de infecciones mixtas.....	119

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribución de la enfermedad de pacientes por sexo.	99
Gráfico 2. Distribución de la edad de los pacientes.....	100
Gráfico 3. Distribución de la enfermedad según nacionalidad.....	100

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Mycobacterium tuberculosis* Complex

El Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) incluye a las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG (cepa utilizada en la vacuna de la tuberculosis), *M. bovis* ssp. *Bovis*, *M. bovis* ssp. *Caprae*, *M. africanum* (microorganismo que se considera intermedio entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* que causa tuberculosis (TB) humana en África), *M. microti* (patógeno de roedores) y *M. canettii*, productoras todas ellas de tuberculosis. En la actualidad *M. bovis* rara vez causa enfermedad y los términos bacilo tuberculoso y *M. tuberculosis* prácticamente se consideran sinónimos. Los seres humanos son el único reservorio de *M. tuberculosis*⁽¹⁾.

Desde el punto de vista microbiológico, la morfología del género *M. tuberculosis* suele ser característica; bacilo delgado de forma recta o ligeramente curvada en frotis teñidos, y su tamaño suele ser de 1-4 micras de largo por 0,3-0,5 micras de ancho. Ocasionalmente, forma ramificaciones verdaderas que se observan en frotis de cultivos líquidos o de muestras clínicas directas. Son bacilos ácido-alcohol resistente mediante la tinción de Ziehl-Neelsen. Con esta tinción, los bacilos aparecen de color rojo brillante sobre un fondo azul. Los bacilos tuberculosos son difíciles de teñir con la tinción de Gram, y se observan como bacilos gram positivos. Son bacilos no formadores de esporas, sin flagelos ni cápsula. La estructura celular de *M. tuberculosis* consta de una gruesa pared y en ella están presentes los ácidos micólicos, que son ácidos grasos de gran importancia taxonómica en micobacterias. Presentan en su estructura más externa una serie de lípidos como los sulfolípidos, los micósidos y el *cord factor*, llamado así por su aparente asociación con la forma acordonada con que se agrupan las

micobacterias virulentas. No difiere del resto de las bacterias en cuanto al citoplasma y el ADN nuclear.

Las micobacterias son aerobios estrictos y no crecen en ausencia de oxígeno. *M. tuberculosis*, se desarrollan de forma adecuada en medios simples aunque para el aislamiento primario de muestras clínicas, se requieren medios más complejos. Los bacilos tuberculosos tienen un crecimiento muy lento, incluso en condiciones óptimas y requieren de 10 a 20 días de incubación a 37°C. El pH óptimo de crecimiento es de 7. El tiempo de duplicación de *M. tuberculosis* en las mejores condiciones de cultivo es de 15 a 18 horas, tardando varias semanas (de 1 a 3) en aparecer colonias visibles en los medios de cultivo (Löwenstein-Jensen).

Las micobacterias son muy resistentes a la desecación. El medio ambiente en el que se encuentran constituye un factor muy importante para su viabilidad. Cuando se exponen a la luz solar directa, los bacilos tuberculosos de los cultivos son destruidos en 2 horas, pero si estos están presentes en una muestra clínica, pueden permanecer viables durante más tiempo. Las micobacterias son más resistentes a productos químicos, como los desinfectantes, que otros microorganismos no formadores de esporas, probablemente como consecuencia de su contenido en lípidos, sin embargo son sensibles a los calores húmedos y destruidos por las temperaturas de pasteurización^(2, 3).

1.2. *Mycobacterium avium* Complex (MAC)

El complejo *Mycobacterium avium* (MAC) pertenece al género *Mycobacterium*, dentro de las micobacterias atípicas. En este complejo se incluyen *M. avium*, *Mycobacterium intracellulare* y recientemente se ha caracterizado un tercer grupo dentro del Complejo, la especie *Mycobacterium chimaera*, (*Mycobacterium* especie X) miembro aún no bien estudiado. Dentro de *M. avium* se reconocen cuatro subespecies: subsp. *avium*, subsp. *paratuberculosis*, subsp. *silvaticum* y subsp. *hominissuis*. Ante la imposibilidad de distinguir las especies con las pruebas bioquímicas habituales se recurrió a la agrupación y denominación de complejo *M. avium-M. intracellulare*.⁽⁴⁻⁶⁾

Se trata de bacilos grampositivos, ácido-alcohol resistentes y aerobios. Están encuadrados en el grupo III de la clasificación de Runyon, es decir, son de crecimiento lento y no fotocromógenos. Las tinciones clásicas de Ziehl-Neelsen y fluorescencia son eficaces para observar la presencia de estos bacilos. Aunque es difícil distinguirlos de las otras micobacterias, podemos hacer un diagnóstico presuntivo por su tamaño muy corto y fino, y por su abundancia en las muestras extrapulmonares. *M. avium* Complex crece a 37 °C en los medios convencionales, tardando 3 ó 4 semanas, con una apariencia de tapiz fino, no cromógeno ⁽⁷⁾.

M. avium es el causante de la tuberculosis en las aves y *M. intracellulare* es el antiguo bacilo de Battey, aislado por primera vez en un paciente tuberculoso en Battey, Georgia (USA). Son ubicuos en el ambiente y capaces de causar enfermedades en los animales y en el hombre, pero no hay evidencia de la transmisión de persona a persona. En el hombre pueden producir enfermedad tanto en las personas inmunocompetentes como en los inmunodeprimidos, especialmente en los infectados por el virus VIH ⁽⁸⁾. En estos pacientes produce una infección diseminada, asociada con una gran mortalidad, sobre todo en los que presentan recuentos de linfocitos CD4 <100 células/mm³. En los años pasados de la epidemia de sida, la frecuencia de la infección oportunista por el

complejo MAC aumentó drásticamente aunque, en la actualidad, el tratamiento con las combinaciones de antirretrovirales de alta potencia ha descendido la incidencia.

1.3. *Mycobacterium kansasii*

Mycobacterium kansasii fue descrito en 1953. Es un microorganismo ubicuo, que se ha encontrado en el suelo, agua, productos animales y alimentos diversos. Se ha aislado del agua del grifo y se ha postulado que es el principal reservorio de este microorganismo asociado a la patología humana. También se ha sugerido la posibilidad de que se transmita por la leche. El aislamiento frecuente en el tracto gastrointestinal de pacientes con infección por el VIH indica que esta vía podría ser la de entrada del microorganismo ⁽⁹⁾.

En los últimos 20 años, se ha incrementado la descripción de casos asociados a este microorganismo en todo el mundo y varias series españolas han comunicado que este microorganismo es el segundo más frecuentemente aislados en procesos respiratorios por micobacterias ⁽¹⁰⁾.

Micobacteria cuya infección se asocia a defectos inmunológicos locales o sistémicos, como las neumopatías crónicas (neumoconosis, EPOC, fibrosis pulmonar, bronquiectasias, mucoviscidosis), tuberculosis pulmonar previa, cardiopatías, hepatopatías crónicas, algunas hemopatías, tratamiento prolongado con esteroides, trasplante de órganos, linfocitopenia CD4 idiopática y, sobre todo, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Rara vez se asocia a enfermedad infantil, incluso en áreas de alta prevalencia, salvo algunos casos descritos de linfadenitis. Cursa como un proceso respiratorio crónico, generalmente en el lóbulo superior y con lesiones cavitadas, con características semejantes a la tuberculosis. *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium avium* son las dos micobacterias no tuberculosas más frecuentemente asociadas a infección respiratoria. Raramente produce

infecciones diseminadas, excepto en pacientes con deterioro de la inmunidad celular ⁽¹¹⁾.

Desde el punto de vista microbiológico, en la tinción de Ziehl-Neelsen *M. kansasii* se observa como bacilos más largos y gruesos que *M. tuberculosis*, además de presentar bandas transversales ya que se tiñen de forma desigual, lo que le da un aspecto atigrado o en rosario. Es una especie de crecimiento lento y fotocromógena en el 96% de las cepas. Las colonias son visibles después de 1 a 2 semanas de incubación en la oscuridad, en general son lisas y de color marfil. Si se desarrollan en la luz son de color amarillo limón.

1.4. *Mycobacterium malmøense*

Esta especie fue descrita en 1997 tras el aislamiento en muestras respiratorias de cuatro pacientes de la ciudad de Malmö (Suecia). Desde entonces se han notificado múltiples casos, sobre todo en Europa, de enfermedades pulmonares crónicas en adultos y linfadenitis cervicales en niños. El crecimiento excesivamente lento puede dificultar su recuperación y la valoración de la incidencia real de esta micobacteriosis. Son cocobacilos ácido-alcohol resistentes, que no producen pigmento y se muestran inertes a casi todas las pruebas bioquímicas ⁽¹²⁻¹⁵⁾.

1.5. Evolución histórica de la tuberculosis

La tuberculosis acompaña al hombre desde sus orígenes. Hasta hace poco tiempo, la explicación “tradicional” y más aceptada del origen de la tuberculosis era que se trataba de una enfermedad no muy antigua evolutivamente y que *M. tuberculosis* surgió como una variedad de *Mycobacterium bovis*. Un estudio publicado recientemente⁽¹⁶⁾ que compara genéticamente variedades de *M. tuberculosis* encontradas al Este de África, sugiere que estas, comparten un ancestro común, de hace unos 3 millones de años. Este dato, parece indicar que la tuberculosis pudo ser una de las enfermedades más antiguas de nuestra especie, afectando a los primeros homínidos, y que su expansión pudo coincidir con las olas de migraciones de *Homo sapiens* desde África hace unos 200.000 años.

Los casos más antiguos de tuberculosis reportados en humanos están fechados en 5000 años a.C. y están descritos como mal de Pott dorsal en un esqueleto de Heidelberg, Alemania y en otro encontrado en Liguria, Italia.⁽¹⁷⁾ Sin embargo, en estos casos, no hay confirmación microbiológica o genética del diagnóstico por los que podría ser cuestionado.

A pesar de ello, la tecnología del ADN y los hallazgos paleopatológicos en momias han permitido confirmar casos en otras poblaciones, como la Egiptia, donde se ha extraído DNA de *M. tuberculosis* de 19 restos óseos de 2120-500 años a.C. y 25 momias egipcias de 2050-500 a.C.^(18, 19)

Desde Hipócrates y sus discípulos de la escuela de Cos hasta mitad del siglo XIX, se la conoce con el nombre de “tisis” y ni siquiera se admitía la naturaleza infecciosa, ni contagiosa de la enfermedad. Se consideraba una alteración crónica de tipo alimentario, contra la cual se era impotente. Estas doctrinas fueron ampliadas por los médicos de la antigüedad, griegos, romanos y posteriormente por la medicina árabe.

Durante toda la Edad Media, el Renacimiento y la totalidad de los siglos XVII, XVIII la tuberculosis invadía al ser humano. En este momento la tuberculosis era responsable de la muerte de una cuarta parte de todas las muertes que se producían en adultos en el continente europeo. El desconocimiento que existía de esta grave enfermedad causaba tanto miedo como el cólera o la peste, y el temor al contagio llevaba al aislamiento más estricto de los enfermos. En España según el edicto del rey Fernando VI promulgado en octubre de 1751, todo aquel aquejado de tuberculosis era tratado con el mismo rigor que los leprosos.

En el siglo XIX, la enfermedad se propagó en forma de epidemia, como consecuencia del aumento de la población en las ciudades y de las condiciones de hacinamiento en las que se vivía, lo que favoreció en gran medida su diseminación. No solamente afectaba a las personas desnutridas, hacinadas y en extrema pobreza sino que también afectó a los círculos sociales de las grandes ciudades como París. Personajes como Gustavo Adolfo Bécquer, Poe, Dickens, Chopín y Beethoven entre otros la padecieron, dándole el sobrenombre de "*Enfermedad de los románticos*".⁽²⁰⁾

En este momento, se alcanzan varios conocimientos trascendentes: En 1819 *Laënnec* demuestra la correlación anatomoclínica, al conseguir emparejar los hallazgos patológicos con los signos y síntomas de la enfermedad, en 1865 *Villemin* demuestra la contagiosidad del proceso y que se transmite por vía aérea. El término *Tuberculosis* (del latín, tubérculum-tubérculo, y del griego bacteria-bastoncillo) fue adoptado después de que el alemán Robert Koch demostrara en una comunicación científica el 24 de marzo de 1882, en el transcurso de una sesión de la Sociedad de Fisiología de Berlín, que *Mycobacterium tuberculosis*, luego también denominado el *bacilo de Koch*, era el único agente causante y que el estado nutricional del paciente no era propiamente la causa de la enfermedad sino un factor condicionante y agravante, y que la causa única era la infección por este microorganismo ⁽²¹⁾.

Surge así la época de los grandes sanatorios antituberculosos europeos basados en el principio del aislamiento de los pacientes iniciado por los

españoles. Se fundaron los primeros sanatorios en la Silesia en 1859 y posteriormente comenzaron a implantarse en otras partes del mundo.

A comienzos del siglo XX, con la mejora de las condiciones socio-sanitarias de la población, las tasas de la morbilidad y mortalidad de la tuberculosis se redujeron en los países desarrollados, a lo que contribuyó de manera importante la introducción de la quimioterapia a principios de los años 50.

En 1944 se descubre la estreptomina, luego el ácido paraminosalicílico, la tiosemicarbazona, y la isoniacida. Hacia 1963 se descubrió la rifampicina en Italia, que en combinación con los anteriores, produjo un enorme cambio del tratamiento sanatorial al tratamiento ambulatorio ⁽²⁰⁾.

En la década de los 80, el número de casos de tuberculosis experimentó un gran incremento. Las causas de este aumento fueron una menor vigilancia en el control de la enfermedad, como consecuencia del éxito con los tratamientos farmacológicos utilizados, la aparición del virus de la inmunodeficiencia humana, y la inmigración desde países en los que la prevalencia de la enfermedad era elevada ^(22, 23). También la aparición de problemas sociales, como el aumento de la pobreza, así como la desaparición de las unidades especializadas en el diagnóstico, tratamiento y control en algunos países. De forma simultánea a este fenómeno, empezaron a aparecer cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos antituberculosos de primera línea ^(20, 24, 25).

En la actualidad la tuberculosis sigue siendo una enfermedad no controlada y una de las primeras causas de muerte a nivel mundial ^(26, 27). Un tercio de la población mundial (2.000 millones de personas) está infectada por el bacilo tuberculoso y de ellos, un 10% desarrollará la enfermedad a lo largo de su vida ^(22, 23). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 9 millones de habitantes del planeta desarrollarán este año la enfermedad y que más de 2 millones morirán por su causa ⁽²⁸⁻³³⁾. El 90% de los casos de tuberculosis se concentran en países en vías de desarrollo, con malas condiciones higiénico-sanitarias que dificultan la instauración de medidas de prevención y control

adecuados. Además el transportes entre los distintos países permite un mayor movimiento migratorio de la población ^(34, 35).

Por todo ello una de las metas planteadas por la Organización Mundial de la Salud y el *“Plan de Estrategia Alto a la Tuberculosis”* es al menos poder detectar el 70% de los casos bacilíferos y tratar de forma adecuada al 85% de los afectados ⁽³⁶⁾.

Actualmente Portugal y España encabezan la lista de países europeos occidentales con más incidencia de tuberculosis, ya que tienen cinco veces más casos de esta enfermedad que otros países de la comunidad como Alemania, Holanda o lo países nórdicos⁽³⁷⁾. En España, se registran cada año entre 11.000 a 15.000 nuevos casos de tuberculosis, una media de 30 casos anuales por cada 100.000 habitantes, de los cuales alrededor del 60% son contagiosos, situando a nuestro país en el segundo lugar de la Unión Europea en número de contagios de esta enfermedad, por detrás de Portugal^(38, 39). La expansión de la tuberculosis en las últimas décadas en España se debe a su relación con el VIH, la drogadicción, la falta de adherencia del enfermo a un tratamiento prolongado, la aparición de resistencias y la inmigración ilegal ⁽⁴⁰⁻⁴³⁾.

A pesar del retroceso experimentado en los últimos años en nuestro país, la tuberculosis dista mucho de estar controlada, y a su vez la línea descendente iniciada hacia el año 1998 se ha estancado recientemente e incluso en algunas comunidades, como es el caso de la de Madrid, tiende a repuntar. ⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾

Para lograr reducir la incidencia de tuberculosis en la población mundial, se necesita un diagnóstico clínico-microbiológico rápido y eficaz, la realización de forma correcta del tratamiento antituberculoso y la aplicación de las correspondientes medidas de preventivas y de control ⁽⁴⁷⁾. El diagnóstico precoz de la tuberculosis permitiría instaurar un tratamiento rápido que evitaría el contagio de un mayor número de personas del entorno más cercano del paciente.

1.6. Evolución de las técnicas del laboratorio de Microbiología en el diagnóstico de la tuberculosis.

El laboratorio de Microbiología Clínica juega un papel fundamental, en la rápida detección de los bacilos tuberculosos, su correcta identificación y en proporcionar el patrón de sensibilidad del microorganismo implicado en el proceso ^(48, 49).

El diagnóstico microbiológico de la tuberculosis ha sufrido una rápida evolución en los últimos años. Desde un principio el diagnóstico se ha fundamentado en la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en las muestras clínicas mediante microscopía (baciloscopia) y su aislamiento en medios de cultivo específicos, como método de referencia. La microscopía ha sido la única prueba rápida desde el principio en el diagnóstico de la tuberculosis. La sensibilidad de esta técnica oscila entre el 60 y el 70%. Esto ocurre cuando la muestra analizada contiene más de 100.000 bacilos ácido-alcohol resistentes por mL (BAAR/mL), aunque la sensibilidad del método mejora sensiblemente cuando se trata la muestra con auramina y se utiliza el microscopio de fluorescencia, aumentando considerablemente la sensibilidad; pudiendo detectarse bacilos cuando la concentración de ellos en la muestra es de 10.000 BAAR/ml.

Esta sensibilidad de la microscopía podría ser aceptable en la tuberculosis pulmonar activa, donde el número de bacilos en la muestra suele ser elevado, pero no lo es en el caso de las micobacteriosis extrapulmonares y en las formas paubacilares de la enfermedad (meningitis tuberculosa o tuberculosis renal).

De esta manera, el cultivo sigue siendo la clave y el método “de referencia” para el diagnóstico definitivo de la tuberculosis. También posee sus limitaciones, tales como la lentitud, a pesar de la incorporación en los últimos

años de los medios de cultivo líquidos, siendo necesarios entre 7 y 14 días como mínimo.

En 1990 se publicaron las primeras recomendaciones por parte del Centro para el Control de las Enfermedades (CDC) en Estados Unidos, para el diagnóstico y control de la tuberculosis, que incluían protocolos de laboratorio para la detección, identificación y determinación de los patrones de sensibilidad.

Estas recomendaciones se basaban en que la detección e identificación de las micobacterias aisladas de las muestras clínicas, no debería realizarse en más de 14-21 días desde la obtención de la muestra y que unido a la determinación de la sensibilidad a los antimicobacterianos de primera línea, no debería ser superior a 28 días. Estas recomendaciones estaban fundamentadas en los métodos microbiológicos convencionales, es decir, el examen microscópico, y el cultivo de las muestras clínicas, así como la identificación de las diferentes especies en función de los tiempos de crecimiento y pruebas bioquímicas ^(50, 51)

En los últimos 20 años se han desarrollado métodos basados en medios de cultivo líquidos, de lectura automatizada o semi-automatizada, que han permitido acortar el tiempo diagnóstico y han facilitado el trabajo en los laboratorios. La baciloscopia sigue siendo el método más rápido existente, posee una especificidad alta y un coste económico reducido, por lo que constituye la principal herramienta diagnóstica en muchos países en los que la incidencia de la enfermedad es elevada. Sin embargo, su sensibilidad es limitada en las formas extrapulmonares, exceptuando las ganglionares ⁽⁵²⁾.

En los últimos años el desarrollo tecnológico ha permitido que numerosos métodos moleculares hayan sido desarrollados para el diagnóstico y la identificación de MTBC en muestras clínicas ⁽⁵³⁻⁵⁶⁾. Estos métodos son capaces de reducir el tiempo de diagnóstico de semanas a días, y por ello cada día están alcanzando una mayor importancia y relevancia en el campo del diagnóstico micobacteriológico ^(57, 58).

Desde el descubrimiento de la PCR en 1986 se ha producido una carrera en el desarrollo de este tipo de técnicas por parte de diferentes compañías que a lo largo de este tiempo han desarrollado diferentes estrategias para conseguir el mismo objetivo, que es la amplificación de ADN o ARN diana y su posterior detección⁽⁵⁹⁾. La secuencia diana más frecuentemente amplificada en MTBC es la *IS6110*, elemento que se repite en el genoma de la micobacteria de 10 a 16 veces. Además algunas técnicas disponen de controles internos de amplificación para poder así controlar todo el proceso desde la extracción.

En 1999, el AMTD (*Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test*) de (GenProbe® San Diego, California) y *Amplicor Mycobacterium tuberculosis Test* de (Roche®) son las dos primeras técnicas genéticas para el diagnóstico e identificación de la TB ⁽⁶⁰⁾ que fueron aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration), de Estados Unidos.

A pesar de los buenos resultados obtenidos en muestras respiratorias con baciloscopia positiva y del consenso existente para su utilización en las mismas, continúa la controversia acerca de cuál es la utilidad real en muestras con baciloscopia negativa (no aprobado por la FDA) y en muestras no respiratorias. Por todo ello, El diagnóstico directo con técnicas de amplificación de ácidos nucleicos debe considerarse, en la actualidad, como un complemento de la metodología diagnóstica convencional, que en ningún caso pueden sustituir en el diagnóstico de la TB a la microscopía y al cultivo, que se consideran actualmente, método de referencia ^(60, 61). Además los resultados obtenidos deben interpretarse en el contexto clínico de los pacientes.

En virtud de las diferentes dianas, métodos de amplificación y detección utilizados existen en la actualidad múltiples sistemas comerciales y caseros.

1.7. Métodos Moleculares para la detección de *M. tuberculosis* Complex y micobacterias atípicas en en muestras clínicas

1.7.1. COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* Test® (F. Hoffman-La Roche Ltd. Basel, Switzerland)

COBAS AMPLICOR MTB está basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ⁽⁶²⁻⁶⁵⁾. El genoma de *Mycobacterium* contiene una región de aproximadamente 1500 nucleótidos que codifican el gen para ARNr 16S. La prueba usa iniciadores biotinilados específicos, para definir una secuencia de aproximadamente 584 nucleótidos dentro de esta región.

La prueba permite la amplificación simultánea del ADN objetivo del *Complejo M. tuberculosis* y el ADN del control interno, mediante la utilización de dos primers específicos, uno para el control interno y otro para la secuencia diana de MTBC. El kit esta diseñado para su empleo sobre muestras respiratorias previamente descontaminadas y concentradas.

La prueba se basa en cuatro procesos principales: Inactivación y extracción del material genético, amplificación mediante PCR usando iniciadores biotinilados, hibridación de los productos amplificados a sondas específicas y la detección del producto amplificado mediante determinación colorimétrica. La prueba permite la amplificación simultánea del ADN diana y del ADN del Control Interno.

Las muestras respiratorias se lavan con una solución de lavado. A continuación se produce la lisis de los microorganismos presentes en la muestras mediante la adición de reactivo de lisis y la aplicación de temperatura (60°) durante 45 minutos. De esta forma y tras la adición de

reactivo neutralizante las muestras quedan listas para su amplificación. Las muestras procesadas se añaden a la mezcla de amplificación, en los tubos de amplificación en los que ocurre la reacción de PCR. La mezcla de la reacción se calienta para desnaturalizar las hélices de ADN bicatenario y exponer así las secuencias objetivo del iniciador. A medida que la mezcla se enfría los iniciadores biotinilados se hibridan con el ADN objetivo. La polimerasa termoestable de ADN de *Thermus aquaticus* (Taq pol), en presencia de Mg^{2+} y excesos de trifosfatos desoxinucleósidos (dNTP), extiende los iniciadores hibridados a lo largo de las plantillas objetivo para producir una secuencia de ADN denominada amplicón. Al analizador COBAS AMPLICOR repite automáticamente este proceso, un número de ciclos determinados, aumentando en cada ciclo la cantidad de amplicones de ADN.

Después de la amplificación por PCR, el Analizador añade automáticamente una solución de desnaturalización a los tubos de amplificación, para desnaturalizar químicamente a los amplicones producidos. A continuación se transfieren alícuotas de amplicón desnaturalizado a pocillos de detección y se agrega a cada pocillo una suspensión de partículas magnéticas revestidas con una sonda oligonucleótida específica. Los amplicones marcados con biotina se hibridan a las sondas específicas conjugadas a su vez con partículas magnéticas. Después de la reacción de hibridación, el analizador lava las partículas magnéticas de los pocillos para eliminar el material no hibridado, y luego añade conjugado de avidina-peroxidasa de rábano, uniéndose al amplicón marcado con biotina. Se añade a continuación una solución de sustrato que contiene peróxido de hidrógeno y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) a cada pocillo. En presencia de peróxido de hidrógeno, la peroxidasa de rábano unida a las partículas magnéticas, cataliza la oxidación de TMB para formar un complejo coloreado cuya absorbancia óptica es medida por el analizador a una longitud de onda de 660nm. Una lectura de absorbancia mayor a 0,350 unidades de densidad óptica, considera positiva la presencia de ADN del MTBC.

Esta técnica COBAS AMPLICOR también dispone de sondas específicas para la detección a partir de muestras clínicas de *M. avium-intracellulare*.

**1.7.2. AMTD2 (Amplified *M. tuberculosis* Direct Assay) ®
(GenProbe, San Diego. CA)**

AMTD2 se fundamenta en la *amplificación mediada por transcripción* (TMA), desarrollada por Kwoh ⁽⁶⁶⁾ y colaboradores y en la *técnica de protección de la hibridación* (HPA) para la detección cualitativa de un fragmento de ARNr 16S específico de *M.tuberculosis Complex*. Este sistema ya es utilizado en los métodos de identificación, con las sondas de ADN, y que por sus características especiales no necesita ningún lavado y la reacción puede realizarse en un único tubo.

Inicialmente los ácidos nucleicos son liberados de la micobacteria mediante sonicación. La amplificación mediada por transcripción TMA se desarrolla de manera isotérmica a 42° y finalmente los amplicones de ARNr son detectados mediante Gen-Probe HPA. El reactivo de hibridación contiene sondas de DNA de cadena sencilla, marcada con quimioluminiscencia. Esta sonda complementaria a *M. tuberculosis Complex*, va a formar híbridos de RNA-DNA que van a ser detectados mediante un lector luminómetro.

La amplificación mediada por transcripción se debe a la acción de dos enzimas: la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (TI) y la ARN polimerasa dependiente del ADN del bacteriófago T7. Además intervienen dos iniciadores, uno con un promotor interno específico de la ARN polimerasa (iniciador 1). La reacción comienza con la hibridación del iniciador 1 con la región específica del ARNr de MTBC seguida de la formación de cDNA de ese fragmento, mediante la TI por unión con el iniciador 1 y la posterior degradación del molde de ARNr por

esta misma enzima. El iniciador 2 se une a la hebra de cDNA recién sintetizado y la TI comienza a producir una hebra de ADN complementaria al cDNA. Es en este momento cuando la ARN polimerasa puede reconocer el promotor del iniciador 1 inserto en la doble hebra de ADN dando lugar entre 100 y 1000 copias de ARNr a partir de este molde. Cada uno de estos transcritos vuelve a entrar en un nuevo ciclo de amplificación que se repite así sucesivamente. Se estima que una sola molécula de ARNr puede dar lugar a varios millones de copias de ARNr en menos de una hora.

Los resultados son expresados en unidades relativas de luz (RLUs) y el tiempo medio necesario para la obtención de resultados mediante esta técnica es de 3,5 horas. Sin embargo, en su versión actual E-MTD no posee control interno ni tiene automatizado ningún paso. Este método fue aprobado por la FDA americana para su utilización en muestras respiratorias con tinción positiva y también en muestras con tinción negativa⁽⁶⁷⁾.

1.7.3. BDPProbeTEC ET® (Becton Dickinson)

Se trata de una técnica semiautomatizada en la que se amplifica de forma simultánea e isotérmica a 52,5°C un fragmento del elemento repetitivo en el genoma micobacteriano, IS6110, específico de *M. tuberculosis Complex*, junto con un fragmento del gen ARNr 16S común a todos los miembros del género *Mycobacterium*. Se utiliza la denominada Amplificación por Desplazamiento de bandas (Strand Displacement Amplification, SDA) y un sistema de detección a tiempo real de los amplicones producidos.

La técnica comienza con el tratamiento manual de las muestras, a las que se les somete a un lavado para la eliminación de posibles inhibidores de la reacción, continuando con la inactivación por calor a

105°C y la lisis de las micobacterias mediante la utilización de un buffer de lisis y agitación mecánica, mediante sonicación.

Una vez realizada la extracción, las muestras son depositadas en cartuchos especiales que son introducidos en la unidad automatizada, donde se produce una fase de descontaminación previa que sigue con la fase de amplificación SDA: El proceso consta de un mellado del ADN bicatenario de la secuencia diana por la acción de una endonucleasa de restricción, seguido de una fase de elongación en la que se sintetiza una nueva hebra que desplaza a la previamente existente. El ADN replicado y las hebras desplazadas sirven de sustrato para nuevas fases repetitivas. La amplificación y la detección del producto amplificado están automatizadas.

La detección se realiza a tiempo real a través de sondas de detección marcadas con fluorescencia que se unen a los amplificados a medida que se van produciendo. Las sondas de detección presentan un colorante fluorescente y un quencher que impide la emisión de cualquier señal fluorescente. Al incrementarse la cantidad del producto amplificado e hibridar las sondas con él pasan a ser moléculas de doble cadena susceptibles a la acción de las endonucleasas, lo que se traduce en un incremento de la señal fluorescente que se detecta mediante un sistema cinético de lectura fluorimétrica en tiempo real.

Este sistema incluye un control interno de amplificación y puede procesar 96 muestras en 3,5 horas. Este método no ha sido aprobado por la FDA para su utilización en EEUU ⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾.

1.7.4. INNO-LiPA RIF.TB line probe assay.

Consiste en una amplificación mediante *nested*-PCR de una región de 70 pb del gen *rpoB* que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa presente en todos los miembros del complejo *M. tuberculosis*, seguida de una hibridación reversa. La biotina que actúa de marcador se incorpora durante la fase de amplificación, así el producto amplificado biotinilado es posteriormente desnaturalizado e hibridado con 10 sondas oligonucleótidas inmovilizadas en una tira reactiva a modo de líneas paralelas. El híbrido se detecta mediante una reacción colorimétrica que está automatizada (AutoLiPA). El ensayo se completa en aproximadamente 12 horas. El sistema LiPA sirve para detectar el complejo *M. tuberculosis* y, a la vez, la resistencia a la rifampicina ^(71, 72). No se incluye ningún control interno que permita detectar inhibiciones. No cuenta con la aprobación de la FDA ⁽⁷³⁾.

1.7.5. RealArt *M. tuberculosis* TM PCR Kit.

Consiste en una amplificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real de una región de 163 pb del gen 16S ARN, específica del complejo *M. tuberculosis*. El producto amplificado se detecta con fluorocromos que van acoplados a sondas oligonucleótidas que hibridan específicamente con la secuencia diana. La señal fluorescente en el transcurso de la PCR a tiempo real hace posible la detección y la cuantificación del producto, sin necesidad de volver a abrir los tubos de reacción. El procesamiento está automatizado (ABIPRISM). Se incluye un control interno para detectar inhibiciones de la reacción de amplificación y éste además puede emplearse para monitorizar las pérdidas de ADN durante la fase de preparación de la muestra. La PCR cuantitativa permite determinar el número de copias/ml presentes en la muestra inicial. El fabricante sitúa el límite de detección entre 0,6-1 copia/ μ l. Dada la reciente aparición no cuenta con la aprobación de la FDA ni se dispone de datos sobre su rentabilidad.⁽⁷⁴⁾

1.7.6. Sistemas de detección caseros.

El método de amplificación elegido suele ser la PCR (incluyendo los protocolos de reamplificación mediante *nested-PCR*, y más recientemente PCR en tiempo real). La secuencia diana más habitual es la IS6110, aunque también se han publicado numerosos trabajos con otras (*hsp65*, *MBP64*, *rpoB*, etc.). Deben emplearse reactivos de referencia y extremarse las medidas para mantener un adecuado control de calidad que permita la monitorización completa del ensayo ^(53, 75-79).

1.7.7. Genotype Mycobacteria Direct (GTMD) (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany).

GENOTYPE MYCOBACTERIA DIRECT (GTMD) se trata de una nueva técnica de microbiología molecular basada en las tecnologías NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) ⁽⁸⁰⁻⁸²⁾ y DNA-STRIPS® que nos permite mediante la amplificación de 23S rRNA, la detección de *M. tuberculosis Complex*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, y *M. malmoense* directamente de los especímenes clínicos descontaminados.

Este sistema está diseñado para el empleo de muestras clínicas respiratorias, descontaminadas: esputos (por expectoración o inducido), broncoaspirados, lavado bronco-alveolar y secreción traqueal ⁽⁸³⁾.

La prueba se divide en tres partes fundamentalmente:

En la primera parte, se realiza la *estabilización y el aislamiento de ARN* de los especímenes descontaminados mediante un método de captura (sonda de captura-bolitas magnéticas): se utilizan 0,5 mL de muestra descontaminada que se mezclan con un buffer de lavado que permite eliminar de la muestra posibles inhibidores de la reacción. A continuación se estabiliza el ARN de las micobacterias

añadiendo otro buffer que nos permitiría en este punto mantener la muestra congelada a -20°C durante un máximo de 3 meses, para su posterior procesamiento. La inactivación de las micobacterias se realiza a 95°C durante 30 minutos y la liberación del ARN se consigue mediante sonicación en un baño previamente precalentado a 60°C . A continuación se realiza el paso de *coupling* o unión del ARN liberado a unas bolitas magnéticas que a su vez tienen unido un control interno de amplificación y sondas de oligonucleótidos específicos del ARN liberado. Finalmente se realizan una serie de lavados con buffer que nos permiten obtener $20\mu\text{l}$ de bolitas cargadas con nuestro ARN objetivo y el control interno de amplificación.

En la segunda parte de la técnica se produce la *Amplificación isotérmica del ARN mediante NASBA* (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification): En el tubo de reacción se mezclan las bolitas magnéticas cargadas con el ARN objetivo, nucleótidos biotinilados, dos iniciadores específicos y una mezcla de tres enzimas claves en la reacción NASBA (Transcriptasa Inversa (TI) del virus de la mieloblastosis aviaria (AMV), RNAsa H y T7 RNA polimerasa). La reacción comienza con la unión al RNA diana del iniciador 1, el cual posee una región específica del RNA diana y a su vez posee una secuencia de cadena sencilla en el extremo 5', promotora de la T7 RNA polimerasa. Este paso continúa con la extensión del iniciador 1 por la TI-AMV, para sintetizar una cadena de cDNA complementaria al RNA diana. El RNA del híbrido de ARN-cDNA es digerido por la RNAsa H y seguido de la unión del iniciador 2 en el extremo 3'. Este iniciador 2 es extendido por la actividad DNA-dependiente de la actividad DNA polimerasa de la TI-AMV, para producir una segunda cadena de DNA que se extiende a través de la zona promotora de la T7 RNA polimerasa. Es en este momento cuando sobre el dsDNA del ARN diana actúa la T7 RNA polimerasa para producir una gran cantidad de RNA complementario al RNA diana (antisenseRNA). Este RNA producido sirve de molde para continuar la fase cíclica, en la cual se va a producir primero la unión del iniciador 2 seguido del iniciador 1. La cantidad de RNA amplificado en la reacción NASBA

puede alcanzar 1×10^9 copias y todos los pasos ocurren de manera isotérmica durante una hora.

Por último, **en la tercera etapa** del proceso, se realiza la *Detección del producto amplificado mediante hibridación reversa* ⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾ : ésta, se realiza mediante un sistema automatizado (Profiblot Tecan®, Maennedorf, Switzerland), que nos permite la agitación, calentamiento y dispensación de los reactivos necesarios para la reacción de detección. Este sistema permite la desnaturalización química del producto amplificado, la hibridación de los amplicones de cadena simple y marcados con biotina a sondas ancladas en una membrana de nitrocelulosa, lavado astringente y revelado de las sondas mediante la adición de conjugado de fosfatasa alcalina/streptavidina y una reacción posterior de revelado mediada por una enzima fosfatasa.

La hibridación también es posible realizarla con la ayuda de un TwinCubator® con bloque de hibridación o en un baño de agua con agitación apropiada y una plataforma de agitación.

Finalmente una plantilla asegura la interpretación sencilla y rápida del esquema de bandas obtenido. GTMD incorpora dos controles internos, para asegurar la fiabilidad de todo el proceso:

Control de Conjugado (CC): debe aparecer una línea en esta zona, documentando la eficacia del conjugado unido y la reacción del sustrato, en el revelado.

Control de Amplificación (AC): cuando la prueba se realiza correctamente, un amplicón control generado durante la amplificación se unirá a la zona de control de la amplificación en la tira. Este control identifica errores producidos durante la realización de la amplificación y el arrastre de inhibidores de la amplificación con el ARN aislado. Si, además de la zona de control del conjugado, sólo aparece desarrollo en esta zona, en primer lugar significa, que la reacción de acoplamiento

durante el aislamiento del ARN, así como la reacción NASBA se realizaron correctamente y, en segundo lugar, que ninguna de las cinco especies de micobacterias detectables con el equipo estaba presente en el espécimen del paciente. En este caso, deben utilizarse otras técnicas de detección. *La amplificación del producto de control puede, sin embargo, suprimirse por la amplificación del producto específico.* En este caso aparece una banda de control del conjugado (CC) y una banda específica de la micobacteria. En este caso, no obstante, la reacción de amplificación fue realizada correctamente y el test no habría de repetirse. Si no se desarrollan ni la zona de control de la amplificación, ni cualquiera de las bandas específicas de micobacterias, el resultado no sería válido y debería repetirse el ensayo.

Figura 1. Modelo de la reacción NASBA en GTMD.

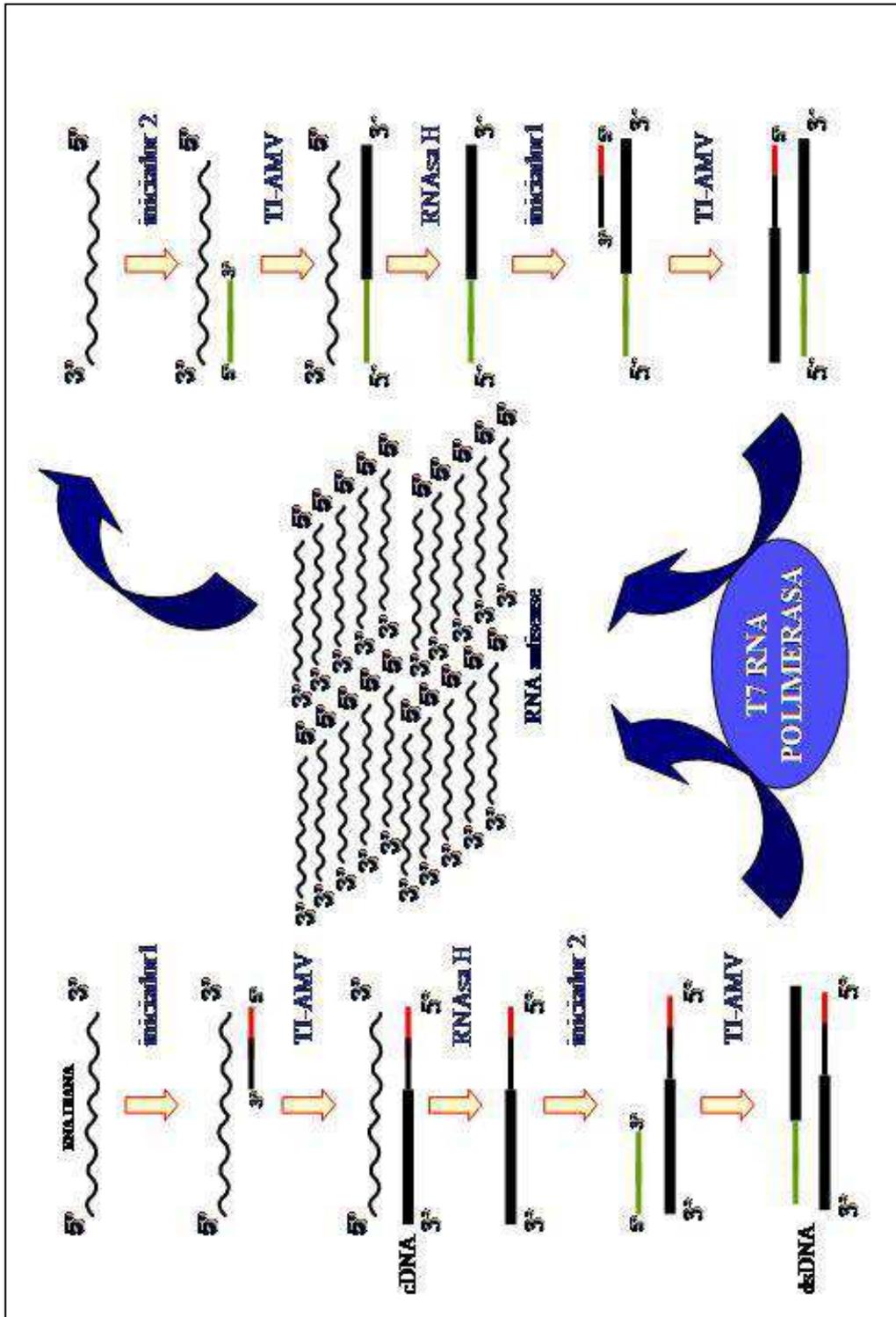
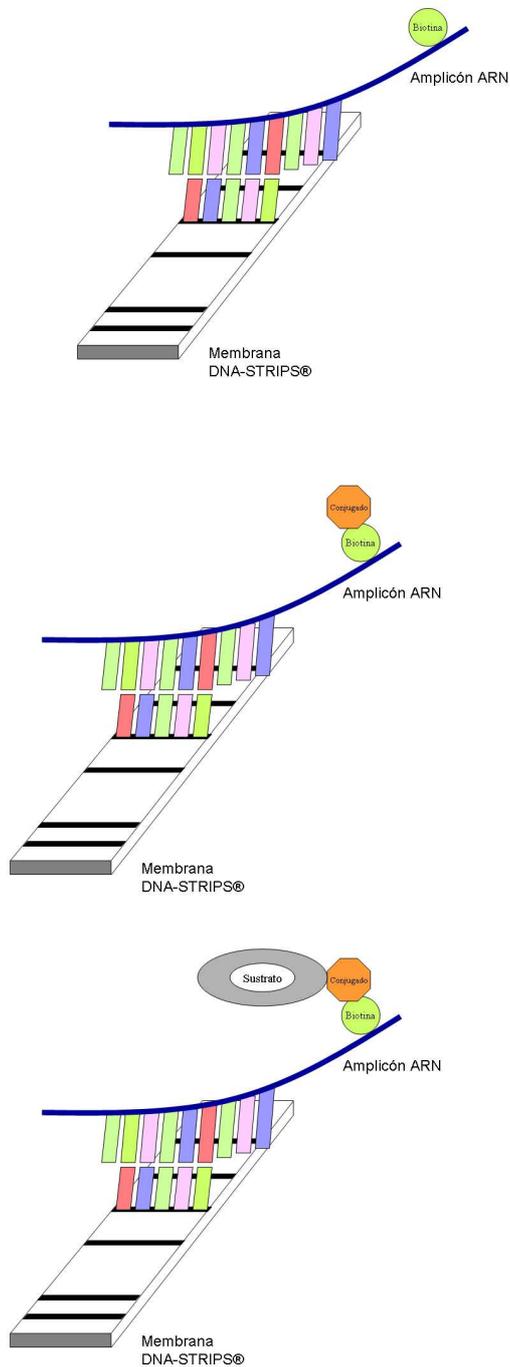


Figura 2. Modelo de detección mediante Hibridación Reversa sobre tira nitrocelulosa.



1. Los amplicones de ARN biotinilados producidos durante el NASBA, se unen de manera específica a su secuencia complementaria anclada en la membrana de nitrocelulosa.

2. El proceso de revelado de las sondas amplificadas comienza con la unión de un conjugado de fosfatasa alcalina/streptavidina que presenta una gran avidez por la biotina presente en los amplicones de ARN.

3. Finalmente se produce una reacción de revelado mediante la adición de una enzima fosfatasa, que cataliza una reacción y que va a permitir la formación de un complejo coloreado, apareciendo una banda, allí donde se produzca la unión de los amplicones de ARN.

Figura 3. Esquema de las sondas presentes en la membrana de detección de GTMD.

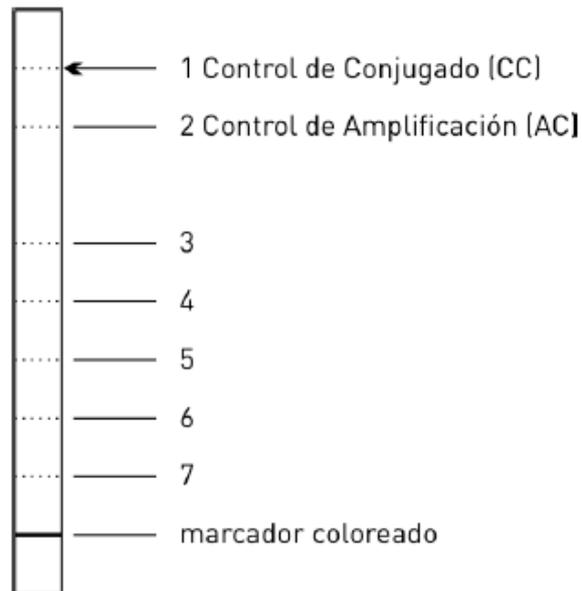
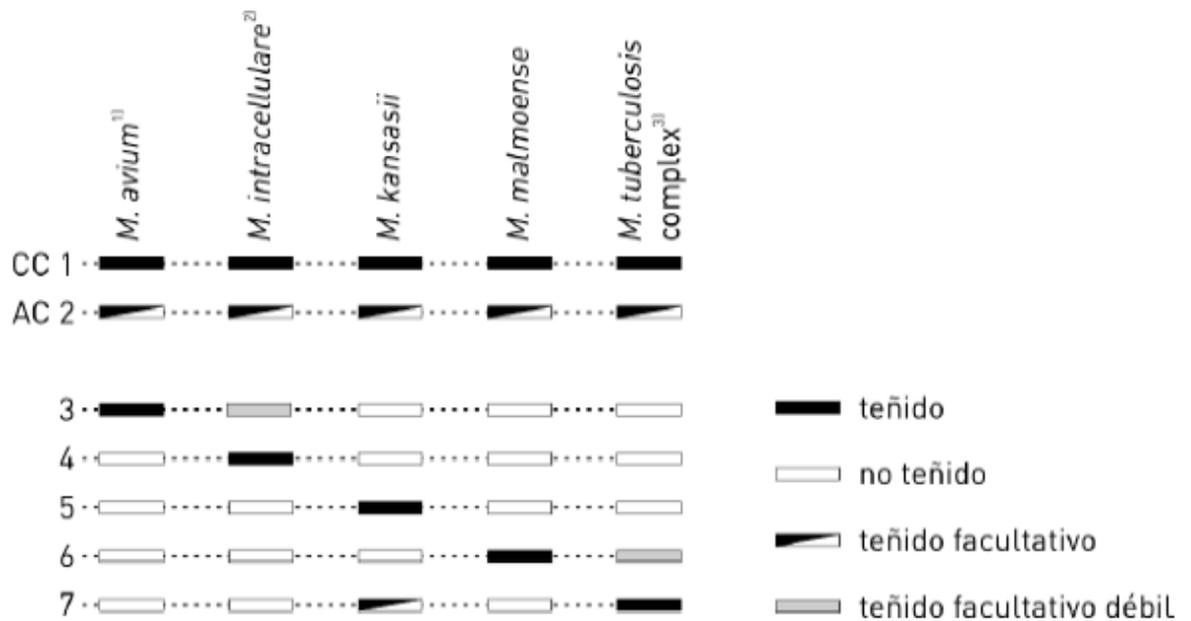


Figura 4. Plantilla para la interpretación de los resultados en GTMD.



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos propuestos en el estudio “**Evaluación de Genotype Mycobacteria Direct, nueva técnica genética de microbiología molecular en la detección de *M. tuberculosis Complex* y otras micobacterias atípicas en muestras de interés clínico.**” son los siguientes:

1. Evaluación de la validez de esta nueva técnica genética de microbiología molecular, Genotype Mycobacteria Direct (GTMD), en la detección directamente de los especímenes clínicos, de *M. tuberculosis Complex*, *M.kansasii*, *M. avium*, *M. Intracellulare* y *M. malmoense*.
2. Comparar Genotype Mycobacteria Direct con el cultivo tradicional de micobacterias y la baciloscopia en el diagnóstico de la enfermedad tuberculosa pulmonar y otras micobacteriosis.
3. Comparar Genotype Mycobacteria Direct con Cobas Amplicor Mtb, en la detección directamente de las muestras clínicas de *M. tuberculosis Complex*.
4. Valorar la utilidad clínica de Genotype Mycobacteria Direct en la práctica habitual del laboratorio de Microbiología.

MATERIAL

3. MATERIAL

3.1. Descripción de la muestra de estudio.

Se procesaron un total de 192 muestras clínicas, respiratorias y extrapulmonares, de las cuales 6 muestras fueron excluidas del estudio (1 muestra de líquido cefalorraquídeo que se contaminó, tres muestras de un mismo paciente en el que el proceso de extracción de ARN no se realizó correctamente y dos muestras negativas que se emplearon como controles).

Para calcular el tamaño muestral necesario para realizar el estudio se ha empleado el programa EpiInfo 6.04d. Se han utilizado los valores de la población que atiende el Hospital U. Reina Sofía (800.000 habitantes), una precisión deseada en el estudio del 6%, una prevalencia esperada del 80%, un efecto del diseño de 1, y un riesgo de al menos un 5% (por defecto). El número de muestras que nos indicó como idóneo el programa estadístico fue de 171. En nuestro caso el número total de muestras clínicas fue de 186.

Tabla 1: Simulación para la determinación del tamaño muestral.

Precisión deseada (%)	6,0
Prevalencia esperada (%)	80
Efecto del diseño	1
Nivel de confianza	95
Tamaño de la muestra	171

De manera que se procesaron para el estudio 186 muestras pertenecientes a 89 pacientes que han estado ingresados o a cargo de diferentes Servicios Médicos del Hospital Universitario Reina Sofía en un periodo de 18 meses

(octubre de 2004 y abril de 2006); de los cuales 63 fueron enfermos tuberculosos o padecieron algún tipo de micobacteriosis.

No fue posible la realización de Genotype Mycobacteria Direct a todas las muestras que se enviaron al laboratorio para el estudio rutinario de micobacterias, debido a que el número de muestras en los que el resultado hubiera sido negativo, sería muy elevado. De manera que se procesaron todas aquellas muestras cuyo resultado de microscopía fue positiva y también aquellas pertenecientes a pacientes con una alta sospecha de padecer tuberculosis pulmonar activa u otro tipo de micobacteriosis.

La procedencia de las muestras procesadas en el laboratorio se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2. Procedencia por Servicios y Hospitales, de las muestras procesadas en el laboratorio.

Hospital U. Reina Sofía	Número de Muestras (N=186)	Int. Conf.95%	Número de Enfermos (N=64)
Infeciosos	84 (45%)	37,9-52,6%	26 (41%)
Neumología	56 (30%)	23,6-37,2%	22 (34%)
Medicina Interna	12 (6%)	3,4-11%	5 (8%)
NC*	7 (4%)	1,5-7,6%	-
Prisión	7 (4%)	0,9-6,2%	5 (8%)
Pediatría	3 (2%)	0,3-4,6%	1 (1%)
Cirugía	2 (1%)	0,1-3,8%	1 (1%)
Neurología	2 (1%)	0,1-3,8%	-
UCI	2 (1%)	0,1-3,8%	1 (1%)
Digestivo	1 (0,5%)	0,0-3,0%	-
Hematología	1 (0,5%)	0,0-3,0%	-
Cirugía Maxilofacial	1 (0,5%)	0,0-3,0%	-
Nefrología	1 (0,5%)	0,0-3,0%	-
Muestras Externas	Número de muestras		Número de Enfermos
H. Andujar	3 (2%)	0,3-4,6%	1 (1%)
H. Jaén	2 (1%)	0,1-3,8%	1 (1%)
H. Puerta del Mar	1 (0,5%)	0,0-3,0%	-
H. Montoro	1 (0,5%)	0,0-3,0%	1 (1%)

*(NC): no consta.

Los Servicios Clínicos de donde se recibieron una mayor cantidad de muestras clínicas fueron Medicina Interna-Infecciosos y Neumología con un 45% y 30% del total de muestras respectivamente. Del mismo modo el 75% de los pacientes enfermos que participaron en el estudio pertenecían a estos Servicios.

3.2. Muestras Clínicas.

Las muestras se han clasificado en función de su localización y del número de bacilos observados mediante la Tinción de fluorescencia Auramina-Rodamina ^(87, 88) y Tinción de Zhiel-Neelsen. Para evaluar el recuento de las baciloscopias se siguieron los criterios de la Sociedad Americana de Microbiología. ⁽⁴⁸⁾

La distribución de las muestras clínicas por pacientes y recuento en la baciloscopia se muestra en la Tabla 1.

En la tabla 2 y 3 puede observarse la distribución de las muestras clínicas procesadas, en función de su localización (respiratoria y extrapulmonar).

Tabla 3. Distribución de las muestras clínicas por paciente.

Nº	PACIENTES	MUESTRA	FLUORESCENCIA 40X	ZIEHL- NEELSEN 100X
1	AALA	ESPUTO	8/10 campos	2 BAAR/10 campos
2	AALA	HECES	2/100 campos	2 BAAR/100 campos
3	AALA	ESPUTO	6/100 campos	4 BAAR/10 campos
4	AHM	ESPUTO	3/10 campos	5 BAAR/100 campos
5	ALA	ESPUTO	7/campo	5 BAAR/100 campos
6	ALJL	ESPUTO	4/10 campos	1 BAAR/100 campos
7	ALJL	PLEURAL	F-	NC
8	AMAD	ESPUTO	7/campo	50 BAAR/100 campos
9	AMAD	ESPUTO	7/campo	5 BAAR/1 campo

Nº	PACIENTES	MUESTRA	FLUORESCENCIA 40X	ZIEHL- NEELSEN 100X
10	APR	ESPUTO	3/campo	2 BAAR/100 campos
11	ARJ	BAS	F-	NC
12	BML	SUERO	NC	NC
13	BVA	ESPUTO	20/campo	2 BAAR/1 campo
14	BVA	ESPUTO	2/campo	8 BAAR/10 campos
15	BXM	LCR	F-	NC
16	CCP	L.ASCÍTICO	F-	NC
17	CGA	EXUDADO	21/campo	10 BAAR/1 campo
18	CLJ	ESPUTO	7/10 campos	3 BAAR/10 campos
19	CMC	ESPUTO	F-	NC
20	CMJM	LCR	F-	NC
21	CVR	ESPUTO	30/campo	3 BAAR/campo
22	CVR	ESPUTO	2/10 campos	2 BAAR/100 campos
23	CXEC	HECES	F-	NC
24	CXEC	HECES	7/100 campos	ZN-
25	CHJ	ESPUTO	5/10 campos	3 BAAR/10 campos
26	CHJ	ESPUTO	100/campo	50 BAAR/1 campo
27	CHJ	ESPUTO	4/10 campos	3 BAAR/100 campos
28	CHJ	ESPUTO	100/campo	30 BAAR/campo
29	CHJ	ESPUTO	2/10 campos	1 BAAR/campo
30	CHJL	BIOPSIA	300/campo	50 BAAR/campo
31	DGF	ESPUTO	F-	NC
32	DGF	ESPUTO	8/10 campos	7 BAAR/100 campos
33	DGF	ESPUTO	2/10 campos	3 BAAR/100 campos
34	DGF	ESPUTO	1/10 campos	1 BAAR/100 campos
35	DGF	ESPUTO	5/10 campos	5 BAAR/100 campos
36	DMF	ESPUTO	3/campo	18 BAAR/100 campos
37	DMF	ESPUTO	2/10 campos	4 BAAR/100 campos

Nº	PACIENTES	MUESTRA	FLUORESCENCIA 40X	ZIEHL- NEELSEN 100X
38	DRA	ESPUTO	3/campo	2 BAAR/10 campos
39	DRA	ESPUTO	8/10 campos	15 BAAR/100 campos
40	DRA	ESPUTO	7/10 campos	7 BAAR/10 campos
41	GCM	BIOPSIA	F-	NC
42	GMH	LCR	F-	NC
43	GNF	ESPUTO	7/campo	2 BAAR/campo
44	HXV	ESPUTO	1/10 campos	2 BAAR/100 campos
45	HXV	ESPUTO	12/10 campos	3 BAAR/100 campos
46	HXV	ESPUTO	6/10 campos	1 BAAR/100 campos
47	ISAJ	ESPUTO	3/ campo	13 BAAR/10 campos
48	JFF	PLEURAL	F-	NC
49	KA	ABSCESO	F-	NC
50	LAE	BIOPSIA	F-	NC
51	LAE	BIOPSIA	F-	NC
52	LBR	ESPUTO	50/campo	15 BAAR/campo
53	LBR	ESPUTO	5/100 campos	5 BAAR/100 campos
54	LBR	ESPUTO	10/campo	1 BAAR/campo
55	LCM	ESPUTO	30/campo	2 BAAR/campo
56	LCM	ESPUTO	1/campo	27 BAAR/100 campos
57	LCM	ESPUTO	120/campo	20 BAAR/campo
58	LCM	ESPUTO	25/campo	2 BAAR/campo
59	LCM	ESPUTO	37/campo	8 BAAR/campo
60	LCM	ESPUTO	16/campo	4 BAAR/ campo
61	LCM	ESPUTO	35/campo	15 BAAR/campo
62	LCM	ESPUTO	33/campo	20 BAAR/campo
63	LCM	ESPUTO	45/campo	21 BAAR/campo
64	LFA	ESPUTO	75/campo	30 BAAR/campo
65	LFA	ESPUTO	12/campo	5 BAAR/campo

Nº	PACIENTES	MUESTRA	FLUORESCENCIA 40X	ZIEHL- NEELSEN 100X
66	LHJA	ESPUTO	8/campo	2 BAAR/campo
67	LHJA	ESPUTO	1/campo	2 BAAR/10 campo
68	LHJA	ESPUTO	2/campo	2 BAAR/100 campos
69	LHJA	ESPUTO	4/10 campos	4 BAAR/100 campos
70	LHJA	ESPUTO	2/campo	8 BAAR/10 campos
71	LOMC	ESPUTO	5/100 campos	3 BAAR/100 campos
72	LOMC	ESPUTO	6/10 campos	7 BARR/100 campos
73	LOMC	ESPUTO	4/campos	67 BAAR/100 campos
74	MBB	ORINA	12/100 campos	1 BAAR/100 campos
75	MBB	ORINA	25/100 campos	1 BAAR/10 campos
76	MBP	PLEURAL	F-	NC
77	MEA	LCR	F-	NC
78	MGM	EXUDADO	F-	NC
79	MGM	BIOPSIA	F-	NC
80	MGM	BIOPSIA	F-	NC
81	MGM	BIOPSIA	F-	NC
82	MGM	BIOPSIA	F-	NC
83	MGM	BIOPSIA	F-	NC
84	MJAM	ESPUTO	20/campo	2 BAAR/campo
85	MJAM	ESPUTO	8/100 campos	2 BAAR/100 campos
86	MJDY	PLEURAL	F-	NC
87	MJJ	EXUDADO	F-	NC
88	MLF	ESPUTO	F-	NC
89	MMJ	ORINA	F-	NC
90	MMJ	ORINA	F-	NC
91	MMMT	BIOPSIA	F-	NC
92	MPJ	ESPUTO	300/ campo	250 BAAR/campo
93	MPJ	ESPUTO	100/ campo	15 BAAR/10 campos

Nº	PACIENTES	MUESTRA	FLUORESCENCIA 40X	ZIEHL- NEELSEN 100X
94	MPJ	ESPUTO	100/ campo	3 BAAR/10 campos
95	MPJ	ESPUTO	5/10 campos	4 BAAR/10 campos
96	MPJ	ESPUTO	30/campo	1 BAAR/campo
97	MRJJ	ESPUTO	5/10 campos	1 BAAR/10 campos
98	MRJJ	ESPUTO	2/campo	15 BAAR/100 campos
99	MRJJ	ESPUTO	4/100 campos	1 BAAR/100 campos
100	MRJJ	ESPUTO	4/100 campos	ZN-
101	MRJJ	ESPUTO	8/10 campos	36 BAAR/100 campos
102	MRJJ	ESPUTO	4/campo	7 BAAR/10 campos
103	MXZ	ESPUTO	20/campo	8 BAAR/campo
104	NLJA	BIOPSIA	F-	NC
105	NLLJM	ESPUTO	F-	NC
106	NLLJM	ESPUTO	F-	NC
107	ORJL	ESPUTO	20/campo	15 BAAR/campo
108	ORJL	ESPUTO	100/campo	30 BAAR/campo
109	PCB	ESPUTO	2/campo	18 BAAR/10 campos
110	PCJ	BIOPSIA	F-	NC
111	PCZJ	HECES	5/campo	15 BAAR/100 campos
112	PCZJ	HECES	5/10 campos	2 BAAR/10 campos
113	PCZJ	HECES	3/10 campos	15 BAAR/100 campos
114	PRJM	ESPUTO	2/ campo	4 BAAR/100 campos
115	PRJM	ESPUTO	F-	NC
116	PRJM	ESPUTO	7/100 campos	6 BAAR/100 campos
117	PRP	ESPUTO	2/10 campos	3 BAAR/100 campos
118	PRP	ESPUTO	3/10 campos	2 BAAR/10 campos
119	PVR	ORINA	F-	NC
120	QOLF	ESPUTO	15/campo	11 BAAR/campo
121	QOLF	ESPUTO	10/campo	8 BAAR/campo

Nº	PACIENTES	MUESTRA	FLUORESCENCIA 40X	ZIEHL- NEELSEN 100X
122	QOLF	ESPUTO	6/100 campos	3 BAAR/100 campos
123	RCR	ESPUTO	14/100 campos	1 BAAR/100 campos
124	RCR	ESPUTO	2/10 campos	5 BAAR/100 campos
125	RER	BAS	F-	NC
126	RFF	LCR	F-	NC
127	RGA	ESPUTO	3/campo	62 BAAR/100 campos
128	RGA	ESPUTO	3/campo	12 BAAR/10 campos
129	RGA	ESPUTO	3/10 campos	15 BAAR/100 campos
130	RGA	ESPUTO	120/campo	50 BAAR/campo
131	RGA	ESPUTO	3/campo	70 BAAR/100 campos
132	RGA	ESPUTO	12/campo	5 BAAR/campo
133	RGA	ESPUTO	6/10 campos	1 BAAR/100 campos
134	RGA	ESPUTO	15/100 campos	1 BAAR/100 campos
135	RGA	ESPUTO	9/100 campos	ZN-
136	RGS	ESPUTO	F-	NC
137	RGS	ESPUTO	F-	NC
138	RJC	ESPUTO	1/10 campos	ZN-
139	RJC	ESPUTO	5/100 campos	4 BAAR/100 campos
140	RJC	ESPUTO	15/100 campos	6 BAAR/100 campos
141	RJC	ESPUTO	13/10 campos	8 BAAR/10 campos
142	RLML	BAS	F-	NC
143	RMG	ESPUTO	14/100 campos	2 BAAR/100 campos
144	RMG	ESPUTO	25/100 campos	5 BAAR/100 campos
145	RMG	ESPUTO	75/100 campos	15 BAAR/100 campos
146	RMG	ESPUTO	20/100 campos	1 BAAR/campo
147	RMP	ESPUTO	3/campo	30 BAAR/campo
148	RMP	ESPUTO	4/campo	40 BAAR/campo
149	RNMA	ESPUTO	7/100 campos	23 BAAR/100 campos

Nº	PACIENTES	MUESTRA	FLUORESCENCIA 40X	ZIEHL- NEELSEN 100X
150	RRF	ESPUTO	100/campo	85 BAAR/100 campos
151	RRF	ESPUTO	5/campo	4 BAAR/campo
152	RRF	ESPUTO	30/campo	25 BAAR/campo
153	RRF	ESPUTO	15/100 campos	2 BAAR/100 campos
154	RRJ	BAL	10/100 campos	3 BAAR/100 campos
155	RRJ	ESPUTO	32/100 campos	4 BAAR/100 campos
156	RRMA	ESPUTO	F-	NC
157	RTA	ESPUTO	8/10 campos	5 BAAR/10 campos
158	RVF	ESPUTO	F-	NC
159	SAJM	L.ASCÍTICO	F-	NC
160	SCA	EXUDADO	F-	NC
161	SCD	ABSCESO	F-	NC
162	SCD	ABSCESO	F-	NC
163	SCF	BIOPSIA	8/100 campos	1 BAAR/100 campos
164	SEC	ESPUTO	5/10 campos	3 BAAR/100 campos
165	SEC	ESPUTO	12/100 campos	3 BAAR/100 campos
166	SLA	ESPUTO	30/100 campos	5 BAAR/100 campos
167	SLA	ESPUTO	23/campo	5 BAAR/campo
168	SLA	ESPUTO	24/10 campos	1 BAAR/100 campos
169	SLT	ESPUTO	30/campo	15 BAAR/100 campos
170	SLT	ESPUTO	80/campo	1 BAAR/campo
171	SLT	ESPUTO	14/10 campos	1 BAAR/10 campos
172	SMA	BAS	F-	NC
173	SMP	ESPUTO	10/campo	2 BAAR/10 campos
174	SMP	ESPUTO	3/ campo	5 BAAR/10 campos
175	SMP	ESPUTO	2/ campo	12 BAAR/100 campos
176	SMP	ESPUTO	2/ campo	1 BAAR/10 campos
177	TOI	PLEURAL	F-	NC

Nº	PACIENTES	MUESTRA	FLUORESCENCIA 40X	ZIEHL- NEELSEN 100X
178	TOJ	ESPUTO	9/10 campos	55 BAAR/100 campos
179	TOJ	ESPUTO	9/100 campos	3 BAAR/100 campos
180	TPA	BIOPSIA	6/10 campos	3 BAAR/100 campos
181	TTMD	BAL	F-	NC
182	TXM	ESPUTO	4/100 campos	1 BAAR/100 campos
183	TXM	ESPUTO	F-	NC
184	VMAM	ESPUTO	6/100 campos	1 BAAR/100 campos
185	VMAM	BAS	1/ campo	18 BAAR/100 campos
186	VMAM	ESPUTO	3/campo	3 BAAR/10 campos

*(NR): no realizado; (NC): no constan los datos. (F-): Tinción de fluorescencia negativa. (ZN-): Tinción de Zhiel-Neelsen negativo.

Tabla 4. Muestras clínicas respiratorias.

TIPO DE MUESTRA	Nº de muestras
Espito	134
Lavado bronco-alveolar	2
Broncoaspirado	5
Líquido pleural	5
Total	146

Tabla 5. Muestras clínicas extrapulmonares.

TIPO DE MUESTRA	Nº de muestras
Absceso	3
Biopsia	14
Exudado	4
Heces	6
LCR	5
Líquido Ascítico	2
Orina	5
Suero	1
Total	40

3.3. Muestras Control y cepas ATCC.

Para la realización de las muestras de control, se utilizaron muestras respiratorias (esputos), en los que la baciloscopia y el cultivo fueron negativos. Se adicionó 50 µl de una solución 0,5 McFarland de cada una de las cepas ATCC utilizadas (Tabla 4). Las cepas control empleadas en el estudio fueron obtenidas del “*American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA.*

Además se realizaron muestras de control que presentaban una mezcla de de dos especies de micobacterias. *M. tuberculosis Complex* con cada una de las micobacterias atípicas que puede detectar GTMD.

Tabla 6. Cepas Control de Micobacterias.

Nº ATCC	Cepas
25618	<i>M. tuberculosis Complex</i>
23070	<i>M. avium</i>
13209	<i>M. intracellulare</i>
12478	<i>M. kansasii</i>
29571	<i>M. malmoense</i>

Tabla 7. Muestras Control.

Control	Cepas
1	<i>M. tuberculosis Complex</i>
2	<i>M. tuberculosis Complex + M. avium</i>
3	<i>M. tuberculosis Complex + M. intracellulare</i>
4	<i>M. tuberculosis Complex + M. kansasii</i>
5	<i>M. tuberculosis Complex + M. malmoense</i>
6	<i>M. avium</i>
7	<i>M. intracellulare</i>
8	<i>M. kansasii</i>
9	<i>M. malmoense</i>

3.4. Medios de cultivo y Composición química.

⌘ Medio sólido **Löwenstein-Jensen** con y sin Piruvato*:

- ✓ Agua destilada (1.640 ml)
- ✓ Almidón de patata (30,0 g)
- ✓ Asparginina (3,6 g)
- ✓ Citrato magnésico (0,6 g)
- ✓ Emulsión de huevo (1.000 ml)
- ✓ Fosfato monopotásico (2,4 g)
- ✓ Glicerol (12 ml)
- ✓ Piruvato* (37,6 g)
- ✓ Sulfato de magnesio (0,24 g)
- ✓ Verde de malaquita al 2% (0,4 g)

⌘ Medio líquido en tubo indicador de crecimiento BBL **MGIT 960** (Becton Dickinson):

- ✓ Agua (c.s.p 1000 ml)
- ✓ Caldo Middlebrook 7H9 modificado (5,9 g)
- ✓ Indicador fluorescente: tris-4,7-difenil-1,10-fenantrolina rutenio (110 μ l)
- ✓ Peptona de caseína (1,25 g)

3.5. Productos Químicos y Biológicos.

- ✓ Aceite mineral
- ✓ Ácido clorhídrico
- ✓ Agua destilada
- ✓ Agua libre de nucleasas
- ✓ Auramina
- ✓ Azul de metileno
- ✓ Buffer de extracción (TE)
- ✓ Citrato sódico
- ✓ Etanol 100° libre de nucleasas
- ✓ Etanol 70°
- ✓ Etanol 95°

- ✓ Fenol
- ✓ Fosfato potásico
- ✓ Fosfato sódico
- ✓ Fuchina básica
- ✓ Hidróxido sódico
- ✓ N-acetil-cisteína
- ✓ Permanganato potásico

3.6. *Material Fungible y de Laboratorio.*

- ✓ Agitador magnético
- ✓ Asas estériles
- ✓ Autoclave
- ✓ Baño ultrasónico
- ✓ Bloque de calefacción
- ✓ Caballete de portas
- ✓ Cabina de seguridad biológica nivel 2.
- ✓ Centrífuga de seguridad
- ✓ Cronómetro
- ✓ Embudos de cristal
- ✓ Estufas de cultivo
- ✓ Frascos cristal 1 L
- ✓ Gradillas
- ✓ Guantes estériles.
- ✓ Hisopos
- ✓ Jeringas 1mL
- ✓ Mascarilla de seguridad 3M® 8835 S/M
- ✓ Mechero gas
- ✓ Micropipetas (2-1000 µl)
- ✓ Papel de filtro
- ✓ Pipetas estériles (5-10 mL)
- ✓ Pipetas pasteur
- ✓ Portas

- ✓ Puntas de pipeta con filtro (10,20,200 y 1000 µl)
- ✓ Termociclador
- ✓ Tubos Falcon 50 mL
- ✓ Vortex

3.7. Genotype Mycobacteria Direct®.

- ✓ Baño ultrasónico con calefacción
- ✓ Bloque de calefacción
- ✓ Centrífuga de seguridad
- ✓ Cronómetro
- ✓ Hoja de evaluación y plantilla.
- ✓ Separador Magnético (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany)
- ✓ Sonicador
- ✓ Tubos Sarstedt 0,5 mL (n° referencia 72.733.001)
- ✓ Tubos Sarstedt 2 mL (n° referencia 72.693.005)
- ✓ Twincubator® con soporte de amplificación. (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany)
- ✓ Twincubator® con soporte de amplificación. (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany)

Tabla 8. Reactivos utilizados en Genotype Mycobacteria Direct.

PROCESOS	REACTIVOS	CANTIDAD*	T ^a
EXTRACCIÓN	Tampón de bloqueo de inhibición (IRB)	9 mL	2–8 °C
	Tampón de captura de ARN (RCB)	5 mL	2–8 °C
	Tampón bolitas magnéticas (BB)	0,6 mL	2–8 °C
	Tampón de Lavado (WB)	12 mL	2–8 °C
	Bolitas magnéticas (MB)	0,3 mL	2–8 °C
AMPLIFICACIÓN	Liofilizado de la Mezcla de Enzimas (EML)	6x4 reacciones	2–8 °C
	Control Interno/Sondas de Captura (ICR/CP)	3 x 0,7 mL	-20°C
	Control Positivo de ARN (PC-RNA)	0,03 mL	-20°C
	Mezcla del Primers/Nucleótidos (PNM)	0,6 mL	-20°C
	Tampón de Dilución de Enzimas (EDB)	0,35 mL	-20°C
	DMSO al 99,9%	0,8 mL	2–8 °C
	Aceite de parafina (PO)	1 mL	2–8 °C
DETECCIÓN	Tiras marcadas con sondas específicas	24 tiras	2–8 °C
	Solución de Desnaturalización (X-DEN)	0,55 mL	2–8 °C
	Tampón de Hibridación (HYB)	28 mL	2–8 °C
	Solución Astringente de Lavado (X-STR)	28 mL	2–8 °C
	Solución de Aclarado (X-RIN)	55 mL	2–8 °C
	Concentrado del Conjugado (CON-C)	0,28 mL	2–8 °C
	Tampón del Conjugado (CON-D)	28 mL	2–8 °C
	Concentrado del Sustrato (SUB-C)	0,28 mL	2–8 °C
	Tampón del Sustrato (SUB-D)	28 mL	2–8 °C

* Cantidades necesarias para 24 reacciones de GTMD.

Tabla 9. Reactivos utilizados en Genotype Mycobacteria Direct Versión 3.0.

PROCESOS	REACTIVOS	CANTIDAD*	T ^a
EXTRACCIÓN	Tampón Unión (BIN)	6 mL	2–8 °C
	Tampón de lisis (LB)	1,5 mL	2–8 °C
	Tampón bolitas magnéticas (BB)	1,5 mL	2–8 °C
	Control Interno (ICR)	15 µL	- 20°C
	Bolitas magnéticas (MB)	0,8 mL	2–8 °C
AMPLIFICACIÓN	Liofilizado de la Mezcla de Enzimas (EML)	3x8 reacciones	2–8 °C
	Control Positivo de ARN (PC-RNA)	30 µL	-20°C
	Mezcla del Primers/Nucleótidos (PNM)	0,32 mL	-20°C
	Tampón de Dilución de Enzimas (EDB)	0,2 mL	-20°C
	DMSO al 99%	0,8 mL	2–8 °C
	Aceite de parafina (PO)	1 mL	2–8 °C
DETECCIÓN	Tiras marcadas con sondas específicas	24 tiras	2–8 °C
	Solución de Desnaturalización (X-DEN)	0,55 mL	2–8 °C
	Tampón de Hibridación (HYB)	28 mL	2–8 °C
	Solución Astringente de Lavado (X-STR)	28 mL	2–8 °C
	Solución de Aclarado (X-RIN)	55 mL	2–8 °C
	Concentrado del Conjugado (CON-C)	0,28 mL	2–8 °C
	Tampón del Conjugado (CON-D)	28 mL	2–8 °C
	Concentrado del Sustrato (SUB-C)	0,28 mL	2–8 °C
	Tampón del Sustrato (SUB-D)	28 mL	2–8 °C

* Cantidades necesarias para 24 reacciones de GTMD 3.0.

3.8. Cobas Amplicor-MTB®.

- ✓ A-ring®
- ✓ Detection cups®
- ✓ Sistema Informático Amplilink Roche®
- ✓ Soporte A-ring®
- ✓ Termociclador Cobas Amplicor Roche®

Tabla 10. Reactivos utilizados en Cobas Amplicor MTB.

PROCESOS	REACTIVOS	CANTIDAD*	T ^a
EXTRACCIÓN	Solución de lavado (RW)	2x25 mL	2-25°C
	Reactivo de lisis (RL)	3 x 6 mL	2-25°C
	Reactivo de neutralización (RN)	3 x 5 mL	2-25°C
AMPLIFICACIÓN	AmpErase® LD	3 x 0,1 mL	2-8°C
	Control Interno (MYCO IC)	3 x 0,1 mL	2-8°C
	Control Negativo MTB (-)	1 x 0,75 mL	2-8°C
	Control Positivo MTB (+)	10 x 0,75 mL	2-8°C
	Mezcla maestra (Myco MMX)	3 x 1,7 mL	2-8°C
DETECCIÓN	Sondas MTB (Dynabead® KY172T3)	100 determinaciones	2-8°C
	Solución desnaturalización (DN)	100 determinaciones	2-8°C
	Solución conjugado (CN)	100 determinaciones	2-8°C
	Substrato (SB)	75 determinaciones	2-8°C
	Solución de lavado (WB)	500 determinaciones	2-25°C

3.9. Auto-LiPA Profiblot TECAN®.

- ✓ Auto-LiPA®
- ✓ Bandejas de soporte de tiras
- ✓ Botellas de 250 y 500 mL
- ✓ Imanes de agitación

MÉTODO

4. MÉTODO

4.1. Procesamiento de las muestras clínicas.

Por la imposibilidad de procesar todas las muestras que recibimos en el laboratorio, se procesaron todas aquellas muestras procedentes de pacientes sospechosos de padecer tuberculosis pulmonar activa o cualquier otro tipo de micobacteriosis, y también aquellas que sin ser advertidos por los diferentes Servicios Médicos, fueron tinción auramina-rodamina positiva.

4.1.1. Descontaminación

Todas las muestras clínicas fueron sometidas a un proceso de descontaminación con el fin de eliminar la flora bacteriana que acompaña habitualmente a dichas muestras y que impediría o dificultaría el crecimiento de las micobacterias. Las muestras procedentes de cavidades estériles no necesitaron someterse al proceso de descontaminación.

Para la descontaminación de las muestras, aprovechamos la resistencia de las micobacterias frente a distintos ácidos y detergentes. El método utilizado fue la descontaminación mediante N-acetil-cisteína⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾:

- ✓ Meclar un volumen equivalente al de la muestra de N-acetil-cisteína-hidróxido sódico-Citrato sódico.
- ✓ Homogenizar mediante vortex.
- ✓ Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos y agitar periódicamente.
- ✓ Neutralizar la reacción mediante la adición de tampón fosfato (pH 6,8) hasta alcanzar un volumen máximo de 50 mL en tubo Falcon.
- ✓ Agitar en vortex.
- ✓ Concentrar las muestras mediante centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos.

- ✓ Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 2 mL de tampón fosfato.
- ✓ Conservar entre 2-4 °C.

Las muestras procedentes de cavidades estériles se procesaron directamente, tras su concentración, para lo cual se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 minutos.

Se realizaron diferentes alícuotas de las muestras descontaminadas para su posterior utilización en:

- ✓ Realización de las tinciones de fluorescencia auramina-rodamina y Ziehl-Neelsen.
- ✓ Siembra en los diferentes medios de cultivo (Löwestein-Jensen y Bactec MGIT 960)
- ✓ Aplicación de los protocolos de las técnicas de detección de ácidos nucleicos a evaluar en nuestro estudio.
- ✓ Banco de muestras en alícuotas de 1 mL a -80°C .

4.1.2. Tinciones

Todas las muestras seleccionadas para el estudio, una vez descontaminadas, fueron procesadas para la detección de bacilos tuberculosos mediante microscopía. Para ello, se realizaron extensiones sobre porta de cada una de las muestras; a continuación se realizó la tinción de fluorescencia mediante la técnica de “gota gruesa” ^(87, 88), y se observaron mediante microscopía de fluorescencia con el objetivo 40X. A las extensiones positivas se les realizó una tinción de Zhiel-Neelsen, para confirmar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR).

⌘ Tinción de Fluorescencia:

Se realizó una extensión en porta, con una cantidad tres veces superior a la normal de muestra y se dejaron secar al aire.

Técnica:

- ✓ Fijar con calor, sobre la llama del mechero de gas.
- ✓ Colocar los portas sobre el caballete.
- ✓ Cubrir con auramina fenolada durante 15 minutos.
- ✓ Retirar el colorante y lavar con abundante agua.
- ✓ Decolorar la extensión con alcohol clorhídrico durante 11 minutos.
- ✓ Lavar con agua.
- ✓ Cubrir las preparaciones con permanganato potásico durante 2 minutos.
- ✓ Secar al aire.

Las preparaciones se visualizan rápidamente en el microscopio de fluorescencia con el objetivo 40X.

Las muestras positivas se visualizaron como puede observarse en la Imagen 1

Imagen 1. Tinción de auramina-rodamina positiva.

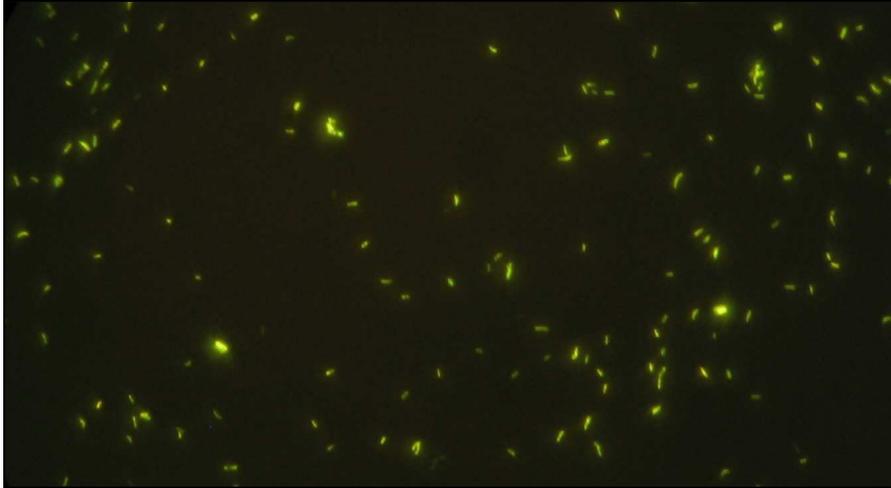


Imagen 1. Caso real de visualización mediante microscopía de fluorescencia en nuestro laboratorio, a través de un objetivo (40X).

Se realizó un recuento inicial, del número de bacilos por cada cien campos en todas aquellas muestras que fueron positivas.

Todas las muestras que fueron positivas tras la tinción de fluorescencia, se les realizó una Tinción de Ziehl-Neelsen confirmatoria.

⌘ Tinción de Ziehl-Neelsen:

Se realizó la tinción de Ziehl-Neelsen sobre las mismas extensiones que se visualizaron como positivas mediante la microscopía de fluorescencia.

Técnica:

- ✓ Colocar los portas sobre el caballete.
- ✓ Cubrir con fuchina fenicada.
- ✓ Con un hisopo metálico con algodón en su extremo, flamear la preparación hasta que se observe la emisión de vapores de fuchina; así hasta tres veces, procurando que no se produzca ebullición ni que se seque la preparación.
- ✓ Lavar las preparaciones con abundante agua para eliminar la fuchina.
- ✓ Decolorar con alcohol-clorhídrico durante 2 minutos.
- ✓ Lavar con agua.
- ✓ Añadir azul de metileno de 2 a 3 minutos.
- ✓ Lavar con agua.

Las preparaciones se dejan secar al aire y se visualizan con microscopio óptico con el objetivo 100X. Las micobacterias ácido-alcohol resistentes, se muestran de color rojo como puede observarse en la Imagen 2.

Imagen 2. Tinción de Ziehl-Neelsen positiva.

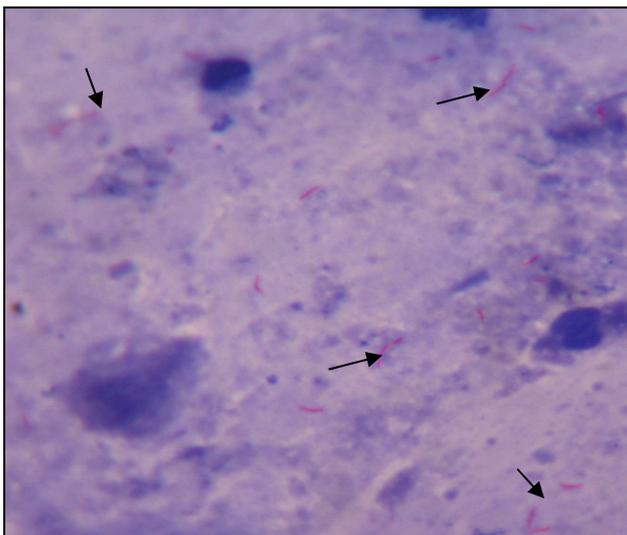


Imagen 2. Caso real de tinción de Ziehl-Neelsen positiva visualizada en nuestro laboratorio, en la que se observan BAAR mediante microscopía óptica (100X).

4.1.3. Cultivo e incubación

Todas las muestras descontaminadas se sembraron en medios de cultivo sólido (Löwestein-Jensen con y sin Piruvato) y en medio de cultivo líquido (Bactec MGIT 960)⁽⁹²⁾ y se incubaron a 37°C.

Periódicamente los medios de cultivo sólidos fueron revisados para detectar el crecimiento de micobacterias. Trascurridos los primeros 30 días, se realizó un informe preliminar negativo. A los 60 días de incubación se realizó un informe negativo definitivo.

En aquellos cultivos en los que se detectó crecimiento, se realizó una extensión sobre porta de las colonias, para confirmar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes mediante una tinción de Ziehl-Neelsen, considerando estos cultivos como positivos.

Por otro lado los medios de cultivo líquidos, se procesaron en el Sistema semiautomatizado Bactec MGIT. Todas las muestras que el sistema detectó como positivas, fueron confirmadas mediante tinción de Ziehl-Neelsen. Las muestras que permanecieron en el sistema un total de 30 días, sin mostrar índices de crecimiento, se informaron como cultivos negativos.

4.2. Identificación de los aislamientos.

Todos los aislamientos procedentes de las diferentes muestras fueron enviadas al Centro de Referencia de Micobacterias (Facultad de Medicina, Córdoba) para ser identificadas. Se utilizaron dos sistemas comerciales diferentes de identificación: AccuProbe (Gen-Probe, Inc., San Diego, California)⁽⁹³⁻⁹⁵⁾ y Genotype Assay (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany).^(86, 96, 97)

4.2.1 AccuProbe (Gen-Probe, Inc., San Diego, California)

AccuProbe utiliza una sonda de ADN monocatenario, conjugado con un marcador quimioluminiscente, complementario al ARNr específico del microorganismo diana. Cuando el ARNr de la micobacteria es liberado en el proceso de detección, la sonda se hibrida con éste para formar un complejo bicatenario ARN-ADN estable. La señal luminosa emitida por el híbrido ARN-ADN, se mide con un luminómetro.

Técnica:

Desactivación y Extracción del DNA de las micobacterias aisladas en los diferentes medios de cultivo tanto en medio sólido (Löwenstein-Jensen) como en medio líquido (Bactec MGIT 960):

- ✓ Resuspender de 2 a 3 colonias de micobacterias, en una solución constituida por la mezcla de dos soluciones: 100 µl de Reactivo de Lisis y 100 µl de Tampón de Hibridación en tubo de lisis especialmente diseñado para ello.
- ✓ Sonicar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- ✓ Incubar las muestras a 95°C en termobloque durante 10 minutos.

Hibridación de las cadenas de ARNr a sonda de ADN marcado:

- ✓ Transferir 100 µl del lisado celular a un tubo de reacción denominado, Reactivo Sonda.
- ✓ Incubar a 60°C en termobloque durante 15 minutos.
- ✓ Añadir 300 µl de reactivo de selección a la muestra.
- ✓ Incubar a 60°C en termobloque durante 10 minutos.
- ✓ Dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Detección del híbrido ARN-ADN en el dispositivo Gen-Probe, Inc.

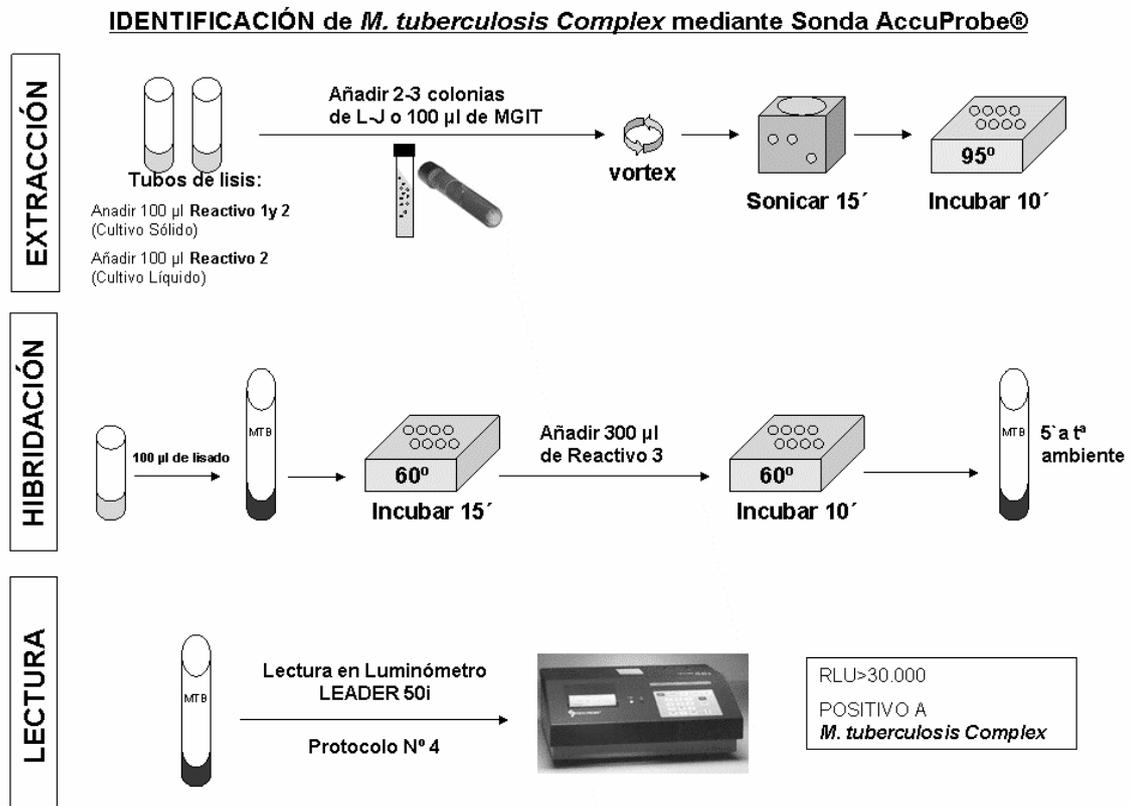
- ✓ Medir la quimioluminiscencia que emite la muestra en Luminómetro (Gen-Probe, Inc.)

El resultado se interpreta como positivo cuando la lectura del luminómetro indica un valor igual o superior al valor umbral de 30.000 UI. El resultado es negativo si indica un valor inferior.

Imagen 3. Lector de la sonda AccuProbe, “Leader 50-i”.



Imagen 4. Diagrama del flujo de trabajo en la realización de la sonda MTB mediante sonda AccuProbe.



4.2.2 Genotype CM Assay (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany).

Genotype CM Assay, es una técnica de microbiología molecular basada en la amplificación mediante PCR de una región específica del gen del ribosoma 16-23S. La detección del producto amplificado se realiza mediante la hibridación reversa de los amplicones de ADN obtenidos sobre unas tiras de nitrocelulosa que llevan ancladas las sondas de ADN específicas de cada una de las especie de micobacteria que es capaz de detectar la técnica.

Las especies de micobacterias que identifica esta técnica se muestran en la siguiente tabla. Genotype CM Assay es capaz de identificar 15 especies diferentes de micobacterias que denomina “*Common species of Mycobacterias CM*”. Además Genotype Assay dispone de otra técnica capaz de identificar otras 17 especies de micobacterias menos frecuentes que se denomina “*Atypical Species of Mycobacteria*”, Genotype AS Assay⁽⁹⁸⁾.

Tabla 11. Especies de micobacterias que identifica Genotype CM/AS Assay.

GENOTYPE® CM ASSAY	<i>M. avium</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. interjectum</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. marinum/ M. ulcerans</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. tuberculosis Complex</i>
GENOTYPE® AS ASSAY	<i>M. simiae</i> <i>M. mucogenicum</i> <i>M. goodii</i> <i>M. celatum</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. genavense</i> <i>M. lentiflavum</i> <i>M. heckeshornense</i> <i>M. szulgai/M. intermedium</i> <i>M. phlei</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. gastri</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. shimoidei</i>

Técnica:

Desactivación y Extracción del DNA de las micobacterias aisladas en los diferentes medios de cultivo tanto en medio sólido (Löwenstein-Jensen) como en medio líquido (Bactec MGIT 960):

- ✓ Cuando las muestras proceden de cultivo en medio sólido, seleccionar con un asa estéril de 2 a 3 colonias y disolver con la ayuda de un mortero en 0,4 mL de buffer (Tris-EDTA).
- ✓ Si las muestras proceden de medio de cultivo líquido (MGIT), aspirar 1 mL aproximadamente del cultivo positivo con pipeta Pasteur estéril y depositar cuidadosamente en un tubo Sarsted de 1,5 mL. Centrifugar a 6000 rpm durante 5 minutos. Desechar el sobrenadante y añadir 0,4 mL de buffer (Tris-EDTA). Agitar en vortex, para mezclar el pellet de micobacterias y el buffer.
- ✓ Calentar las muestras durante 20 minutos a 95° C en termobloque.
- ✓ Sonicar las muestras en baño sonicador a temperatura ambiente durante 15 minutos
- ✓ Centrifugar durante 5 minutos a máxima velocidad.
- ✓ Utilizar sobrenadante como DNA extraído, para mezclar directamente con la Master Mix.

Amplificación del ADN extraído:

- ✓ Preparar la Master Mix de la reacción de amplificación en Área 1, en cabina de flujo laminar:
 - 35 µl de mezcla de nucleótidos (PNM)
 - 5 µl de Buffer 10X
 - 2,5 MgCl₂
 - 0,4 µl de Taq polimerasa
 - 2,1 µl de H₂O
- *Cantidades de reactivos necesarias para una muestra. Preparar Master Mix para N+1 muestras.
- ✓ Dispensar 45 µl de Master Mix más 5 µl del ADN extraído en tubos de PCR de 500 µl.

- ✓ Programar el termociclador con los siguientes ciclos de amplificación:

Tabla 12. Programación del termociclador en Genotype CM Assay.

Tiempos	Temperatura	Ciclos
00:15:00	95°C	
00:00:30	95°C	10 ciclos
00:02:00	58°C	
00:00:25	95°C	20 ciclos
00:00:40	53°C	
00:00:40	70°C	
00:08:00	70°C	
∞	4°C	

- ✓ Programar el termociclador con los siguientes ciclos de amplificación:

Detección del producto amplificado:

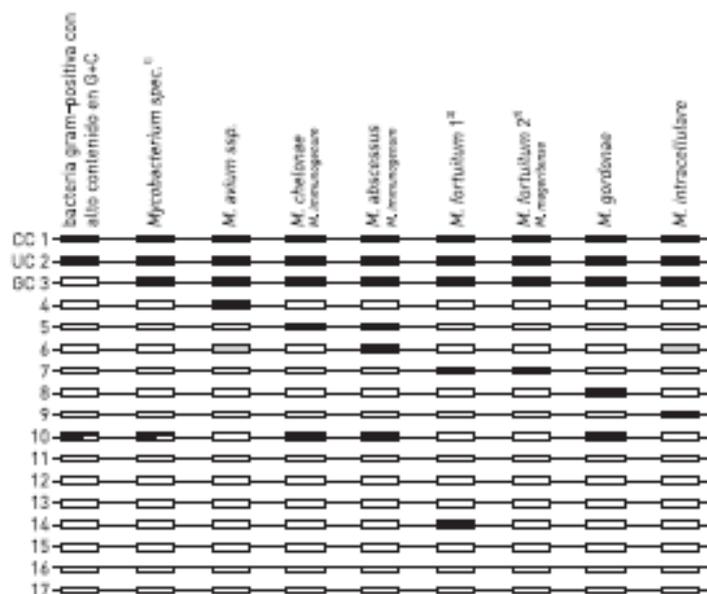
Se realiza mediante la hibridación de los amplicones sobre tiras de nitrocelulosa, que emplean la tecnología DNA-Strips® y que dispone de 17 zonas de reacción, como se observa en la figura 5. El proceso de detección se realiza de manera semiautomatizada mediante el empleo del sistema Profiblot Tecan®. Este sistema permite el calentamiento y dispensación de los reactivos necesarios para el proceso de detección, y es detalladamente descrito más adelante.

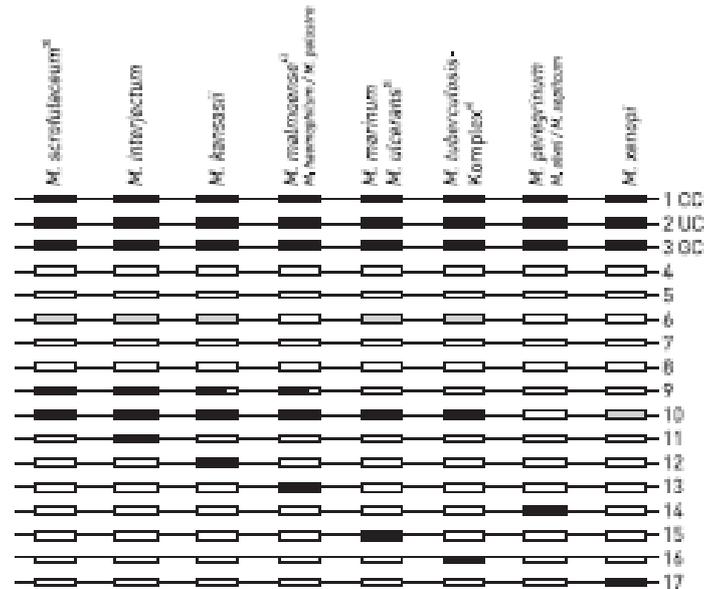
Figura 5. Tira de nitrocelulosa en Genotype CM Assay.



Los amplicones producidos se unirán de manera específica a cada una de las sondas en función de la especie de micobacteria de que se trate. Esto nos permite obtener un soporte sólido, como son las tiras de nitrocelulosa, en la que van a aparecer al final del proceso de detección, una serie de bandas, que se interpretan gracias a un diagrama como puede observarse en la figura 6.

Figura 6. Diagrama para la interpretación de los resultados en Genotype CM Assay.





4.3. Genotype Mycobacteria Direct. (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany)

Genotype Mycobacteria Direct (GTMD) es un nuevo ensayo comercial basado en las tecnologías NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) y DNA-STRIPS® que nos permite mediante la amplificación de 23S ARNr, la detección de *Mycobacterium tuberculosis Complex* (MTBC), *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, y *M. malmoense* directamente de los especímenes clínicos descontaminados ⁽⁸³⁾.

Todas las muestras seleccionadas en nuestro estudio fueron analizadas mediante esta nueva técnica tras su previa descontaminación. GTMD está diseñado para su empleo sobre muestras de origen respiratorio (esputo, broncoaspirado, lavado bronco-alveolar o esputo inducido). Aunque en la evaluación de la técnica se incluyeron otras muestras de origen extrapulmonar (líquido pleural, abscesos, biopsias, exudados, heces, LCR, líquido ascítico, orina y suero).

La técnica se divide en tres pasos fundamentalmente y presenta una duración aproximada de todo el proceso de 4-5h:

- Estabilización y extracción del ARN de los especímenes clínicos descontaminados mediante un método de captura (sonda de captura-bolitas magnéticas).
- Amplificación isotérmica del ARN mediante "Nucleic Acid Sequence Based Amplification" (NASBA).
- Detección del producto amplificado mediante hibridación reversa.

⌘ **Estabilización y extracción del ARN** en los especímenes clínicos descontaminados mediante un método de captura (sonda de captura-bolitas magnéticas).

○ **Desactivación y Ruptura celular:**

- ✓ Pipetear 300 µl del Tampón de Eliminación de la Inhibición (IRB) en un tubo Sarstedt de 2 mL.
- ✓ Añadir 500µl del espécimen descontaminado.
- ✓ Homogeneizar la mezcla con un agitador tipo vórtex.
- ✓ Centrifugar 3 minutos a 12.000 G.
- ✓ Eliminar el sobrenadante.
- ✓ Resuspender el pellet con 100 µl de Tampón de Captura de ARN (RCB).
- ✓ Incubar a 95°C durante 30 minutos.
- ✓ Incubar en baño sonicador, precalentado a 60°C, durante 15 minutos.
- ✓ Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad. (Opcional)

○ **Conjugación de las Bolitas Magnéticas (MB) con el ARN de Control Interno (ICR), la Sonda de Captura (CP) y el ARN liberado en el paso anterior.**

- ✓ Preparar una mezcla de ICR/CP/DMSO: 0,7 mL de ICR/CP y 0,14 mL de DMSO por cada muestra.
- ✓ Homogeneizar la mezcla con un agitador tipo vórtex.
- ✓ Alicuotar 90 µl de la mezcla ICR/CP^{DMSO} en tubos Sarstedt de 0,5 mL.
- ✓ Pipetear 100 µl del lisado celular (o sobrenadante obtenido tras la centrifugación opcional) en los tubos de 0,5 mL que ya contiene 90 µl de una mezcla de ICR/CP^{DMSO}.
- ✓ Añadir 10 µl de Bolitas Magnéticas (MB).
- ✓ Homogeneizar en vortex.

A continuación se lleva a cabo una reacción de acoplamiento en el TwinCubator® (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany) haciendo uso del programa de acoplamiento. Este programa consta de dos etapas de incubación diferentes. Durante la primera, las muestras se incuban a 65°C durante 10 minutos, a continuación, tiene lugar una segunda etapa de incubación de 17 minutos a 25°C combinada con agitación a una frecuencia de 1.100 rpm.

○ **Lavado de las Bolitas Magnéticas cargadas con ICR, CP y ARN. (LMB)**

- ✓ Transferir las muestras a un separador magnético (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany) durante 3 minutos hasta que se haga visible un precipitado o pellet de Bolitas Magnéticas Cargadas (LMB) de color oscuro.
- ✓ Retira entonces el sobrenadante con la barra de separador magnético colocada.
- ✓ Retirar la barra imantada del separador magnético.
- ✓ Resuspender el pellet con 200 µl de Tampón de Lavado (WB).
- ✓ Repetir dos veces este proceso.
- ✓ Anadir 20 µl del Buffer para las Bolitas Magnéticas cargadas (BB) al pellet de LMB.

El LMB puede usarse inmediatamente para la reacción NASBA o mantenerse refrigerado a 4°C durante 24h.

⌘ **Amplificación isotérmica** del ARN mediante "Nucleic Acid Sequence Based Amplification" (NASBA).

- ✓ Preparar una mezcla de Primers/Nucleótidos (PNM) y DMSO en tubo de 0,5 mL. Añadir 7 µl de DMSO a 23 µl de PNM por cada muestra.
- ✓ Agitar la mezcla en vortex.
- ✓ Alicuotar 30 µl de PNM^{DMSO} a un tubo Sarstedt de 0,5 ml.
- ✓ Añadir 10 µl de LMB.
- ✓ Añadir 20–30 µl de aceite de parafina líquido.
- ✓ Reconstituir la mezcla de enzimas de la reacción de amplificación EML con 44 µl de Buffer de dilución de la enzima EDB.

A continuación se lleva a cabo la reacción de amplificación en el TwinCubator® (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany). El proceso comienza con una etapa previa de desnaturalización a 65°C durante 8 minutos (programa P2S1), que sigue posteriormente con un enfriamiento de las muestras a 41°C (programa P2S2) para que de comienzo la reacción en el momento en el que se adiciona a cada tubo 10µl de la mezcla de enzimas previamente reconstituida EML (programa P2S3). De esta forma comienza el proceso de amplificación que se llevará a cabo durante 60 minutos (programa P2S4).

⌘ **Detección** del producto amplificado mediante hibridación reversa.

La hibridación y la detección se llevó a cabo mediante un sistema automatizado (Profiblot Tecan®, Maennedorf, Switzerland). Este sistema permite la agitación, calentamiento y dispensación de los reactivos necesarios en la reacción de hibridación.

- **Preparación de Profiblot Tecan®, reactivos de detección y muestras:**
 - ✓ Encender Profiblot Tecan®.
 - ✓ Aparecerá **Run Program**. Pulsar YES.
 - ✓ Aparecerá **Waste Bottle?** Comprobar que la botella de desecho está vacía y los tubos de desecho se han colocado correctamente. Pulsar YES.
 - ✓ Aparecerá **Check Sieves II**. Comprobar que los filtros en las botellas de agua destilada del circuito cerrado de agua están bien colocados y no están obstruidos. Pulsar YES.
 - ✓ Seleccionar el **programa GTMD**. Pulsar YES.
 - ✓ Aparecerá un valor de temperatura en la pantalla (47°C). Pulsar YES.
 - ✓ Aparecerá **Preparing in progress**. Esperar que el aparato alcance la temperatura deseada de trabajo. Mientras, cargar *Profiblot Tecan®* con los siguientes reactivos:
 - Colocar la vía 1 e imán de agitación en el Buffer de Hibridación (HYB) y este sobre agitador magnético.
 - Colocar la vía 6 e imán de agitación en el Buffer de Lavado (X-STR) y este sobre agitador magnético.
 - Colocar la vía 4 en una solución 1:100 de Conjugado concentrado (CON-C) y Diluyente del Conjugado (CON-D). Para cada tira añadir 10 µl de concentrado a 1 ml de buffer.
 - Colocar la vía 5 en una solución 1:100 de Sustrato concentrado (SUB-C) y Diluyente del Sustrato (SUB-D). Para cada tira añadir 10 µl de concentrado a 1 ml de buffer.
 - Colocar la vía 2 en la solución de Lavado (X-RIN).
 - Colocar la vía 3 en Agua Destilada.
 - ✓ Aparecerá **INSERT TRAY I**.
 - ✓ Preparar la bandeja de reacción en campana de flujo laminar: depositar en la parte superior de cada canal: 20 µl de desnaturalizante + 20 µl de amplificado.
 - ✓ Incubar 5 minutos la mezcla.

- ✓ Colocar la bandeja en el dispositivo Tecan®, pulsar YES.
- ✓ Aparecerá **StPos Strip: 01**, es decir, que comenzará la hibridación en el canal 1 de la bandeja. Pulsar YES.
- ✓ Aparecerá **Nr of Strips: 30**. Teclear el número total de tiras que se van a procesar. Pulsar YES.
- ✓ Aparecerá **Last Aspiration?** Pulsar YES.
- ✓ Aparecerá **Proc. 1 Inc.** Pulsar YES.

○ **Hibridación Reversa:**

Una vez colocada la bandeja con las muestras en el dispositivo, 1 ml de buffer de hibridación (HYB) precalentado es añadido automáticamente. Durante 2 minutos la agitación de la bandeja permite la mezcla entre el buffer de hibridación y los amplicones desnaturalizados, antes de que se produzca una parada en el proceso para introducir en cada canal las tiras de detección/identificación GTMD. El proceso de hibridación se desarrolla a 47°C durante 30 minutos. Seguidamente se produce la aspiración del buffer de hibridación, y se añade 1ml de Solución Astringente de lavado (X-STR), que se incuba a 47°C durante 15 minutos en agitación. La solución de lavado es retirada y se realiza un lavado con agua destilada para retirar cualquier resto de solución de lavado X-STR. Para la detección colorimétrica de los amplicones hibridados, se añade 1 ml de conjugado diluido (1:100 en buffer del conjugado) durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. La solución de conjugado es retirada y las tiras son lavadas con un 1 ml de solución de aclarado (X-RIN) (dos veces). Es aspirado y se añade 1 ml de solución de sustrato diluido (1:100 en buffer del sustrato) que se mantiene sin agitación entre 3 y 15 minutos según la rapidez con que se produzca la aparición de las bandas. Finalmente y después de la retirada del sustrato, se concluye con la parada de la

reacción mediante dos lavados con agua destilada y el secado de las tiras sobre papel de filtro.

○ ***Evaluación e Interpretación de los resultados:***

Una vez que las tiras están completamente secas, son colocadas sobre un formulario de evaluación y mediante una tarjeta de lectura se procede a su interpretación. Cada tira tiene siete zonas de reacción que se corresponde con cada una de las sondas de la tira, como se puede ver en la figura 4.

Control de Conjugado: Debe aparecer siempre una banda en esta zona, documentando así la eficacia del conjugado unido y la reacción del sustrato. De manera, que cualquier análisis que no presente la banda de control de conjugado, debe ser repetido; al menos el proceso de detección.

Control de Amplificación: Si la técnica se ha realizado correctamente, se habrá generado en la amplificación un Control Interno, que se unirá en el proceso de hibridación a la sonda de control de amplificación de la tira. Este control interno, nos permite detectar cualquier problema en el desarrollo de la técnica y también nos permite detectar la presencia de posibles inhibidores de amplificación en la muestra.

Si aparecen las bandas de control del conjugado y control de amplificación significa, que la reacción de acoplamiento durante el aislamiento del ARN, así como la reacción NASBA se realizaron correctamente y además, que ninguna de las cinco especies de Micobacterias detectables con el equipo estaba presente en el espécimen del paciente o por lo menos, no por encima de su nivel de sensibilidad.

Sin embargo la amplificación del control interno puede verse afectada por la amplificación de un producto específico. En este caso estaría presente en la tira de reacción la banda de control del conjugado y la banda de la micobacteria en cuestión. En este caso, la reacción de amplificación fue realizada correctamente y el test no ha de repetirse. Si no se desarrollan ni la zona de control de la amplificación, ni cualquiera de las bandas específicas de micobacterias, el resultado no es válido y debe repetirse el ensayo.

Imagen 5. Separador magnético en el proceso de extracción del RNA.



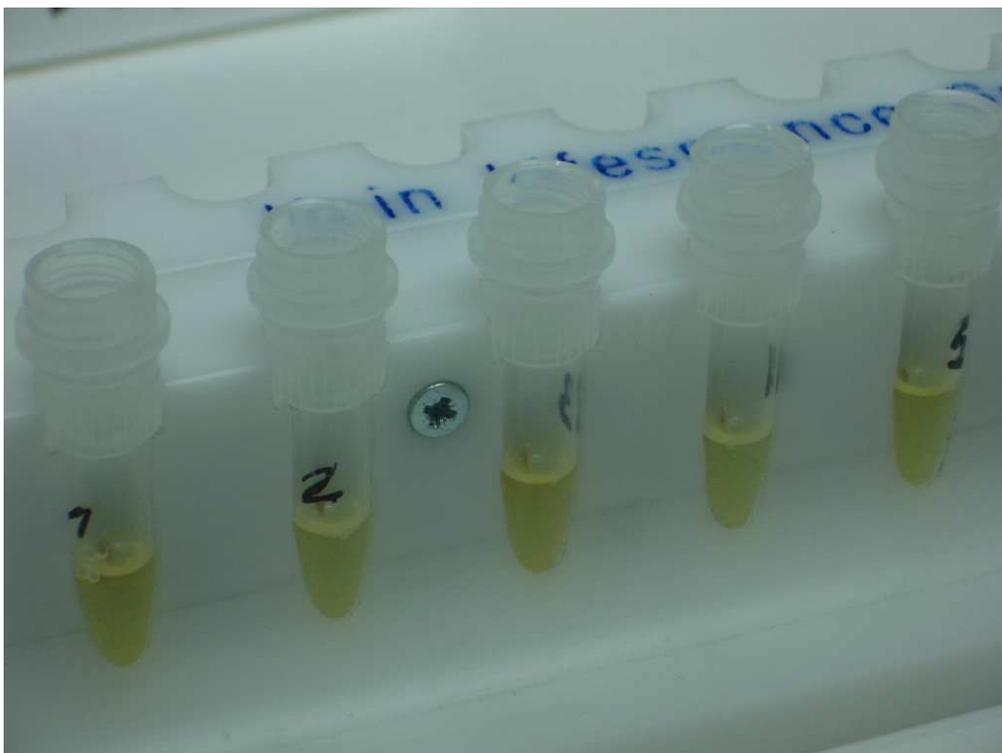


Imagen 6. Liofilizado de la mezcla de enzimas de amplificación reconstituido.



Imagen 7. Tubo de amplificación con y sin enzimas de amplificación.

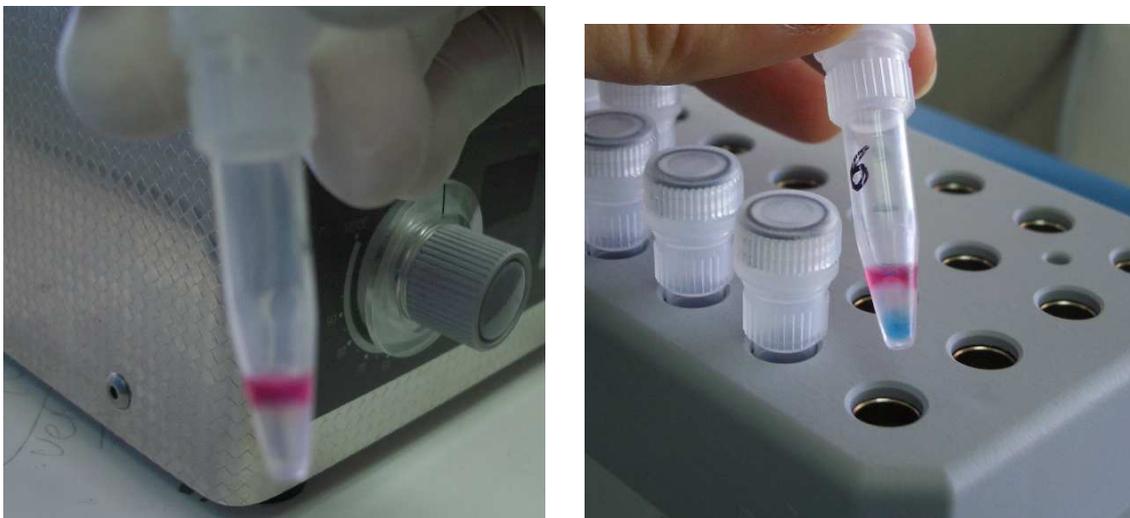


Imagen 8. TwinCubator® con bloque de amplificación



Imagen 9. Profiblot-Tecan®, disposición de reactivos.



Imagen 10. TwinCubator® con bloque de detección.

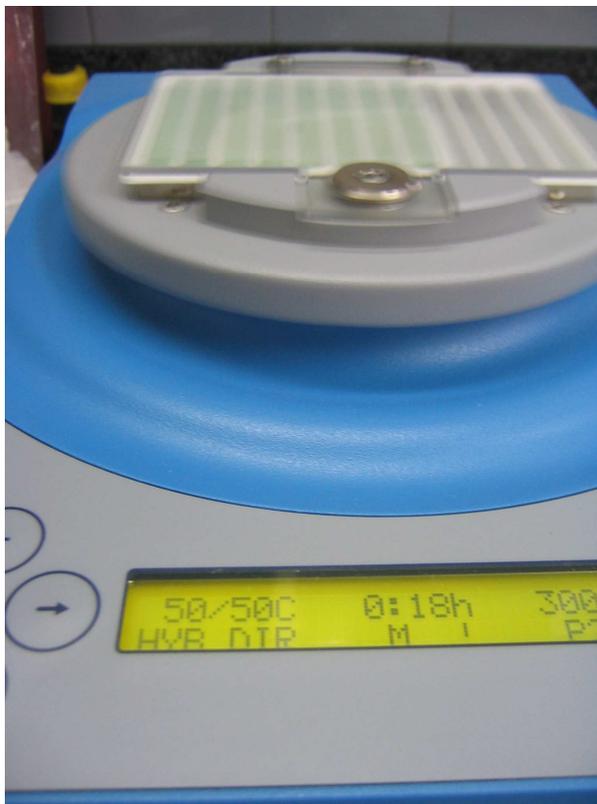


Figura 7. Formulario de evaluación de GTMD.

Una vez secas, las tiras son colocadas en el formulario, identificadas según a la muestra y paciente al que pertenezca y finalmente interpretadas.

GenoType[®] Mycobacteria Direct

18 1 2006
dd mm yyyy

#					CC	AC	M. avium	M. intracellulare	M. kansasii	M. malmoense	M. tuberculosis complex
1	CN				/	/					
2	Suero				/	/					
3	08-108				/	/					
4	08-178				/	/					
5	157				/	/					/
6	155				/	/					/
7	156				/	/					
8	157				/	/					
9	158				/	/					/
10	159				/	/					/
11	160				/	/					
12	161				/	/					
13	162				/	/					/
14	163				/	/		/			
15	164				/	/		/			
16	165										
17											
18											
19											
20											

LOT _____ HYB _____ min STR _____ min SUB 5-10' min

4.4. Genotype Mycobacteria Direct VER 3.0 (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany)

Genotype Mycobacteria Direct VER 3.0 (GTMD V3), se diferencia de la versión original, por presentar un método de extracción de ARN diferente a la primera versión de la técnica. La principal innovación de GTMD V3 es la extracción química de ARN, basada en el empleo de partículas magnéticas.

Del mismo modo, la técnica se divide en tres pasos fundamentalmente:

- Extracción del ARN en los especímenes clínicos descontaminados mediante un método de captura magnética y extracción química.
- Amplificación isotérmica del ARN mediante "Nucleic Acid Sequence Based Amplification" (NASBA).
- Detección del producto amplificado mediante hibridación reversa.

⌘ **Extracción del ARN** en los especímenes clínicos descontaminados:

○ **Preparación de Reactivos para la extracción:**

- ✓ Preincubar LB (Buffer de Lisis) a 37°C. al menos 20 minutos antes de utilizarlo. El reactivos debe estar libre de precipitados, mezclar si es necesario.
- ✓ Preparar Etanol al 70% partiendo de Etanol al 96%. Emplear agua libre de nucleasas. **Se necesita 1 mL. De Etanol por muestra.**

- ✓ Diluir la cantidad de MB (Partículas Magnéticas) necesaria con la cantidad apropiada de BIN (Buffer):

Nº de muestras	Volumen MB	Volumen BIN
1	33 µl	220 µl
2	66 µl	440 µl
3	99 µl	660 µl
4	132 µl	880 µl
5	165 µl	1100 µl
6	198 µl	1320 µl
7	231 µl	1540 µl
8	264 µl	1760 µl
9	297 µl	1980 µl
10	330 µl	2200 µl

- ✓ Inmediatamente antes de usar, añadir la cantidad apropiada de ICR (Control Interno ARN) al BB (Buffer):

Nº de muestras	Volumen ICR	Volumen BB
1	0.5 µl	50 µl
2	1 µl	100 µl
3	1.5 µl	150 µl
4	2 µl	200 µl
5	2.5 µl	250 µl
6	3 µl	300 µl
7	3.5 µl	350 µl
8	4 µl	400 µl
9	4.5 µl	450 µl
10	5 µl	500 µl

○ **Extracción del ARN:**

Unión de las células a las Partículas Magnéticas:

- ✓ Pipetear 230 μ l de la mezcla MB/BIN en un tubo sarstedt de 1.5 mL.
- ✓ Mezclar muy bien la muestra descontaminada, pipeteando varias veces.
- ✓ Añadir 500-1000 μ l de muestra al tubo con MB/BIN. Mezclar pipeteando varias veces. NO USAR EL VORTEX.
- ✓ Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- ✓ Transferir los tubos al Separador Magnético®. (SM)
- ✓ Introducir la barra magnética en el SM. Incubar los tubos en el SM durante 2 minutos.
- ✓ Eliminar el sobrenadante sin perder el pellet de sedimento.

Lisis Celular:

- ✓ Sacar la barra del SM.
- ✓ Disolver perfectamente el LB (Buffer de lisis) y añadir 50 μ l del mismo a cada tubo.
- ✓ Mezclar cuidadosamente pipeteando en cada tubo.
- ✓ Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Precipitado y Lavado de RNA liberado.

- ✓ Añadir 150 μ l de Etanol 96%, mezclar en vortex e incubar 5 minutos.
- ✓ Introducir la barra magnética en el SM e incubar las muestras en el SM durante 2 minutos.
- ✓ Mezclar volteando el SM con los tubos varias veces.
- ✓ Incubar 1 minuto en el SM.
- ✓ Eliminar el sobrenadante sin perder el pellet.

- ✓ Sacar la barra del SM.
- ✓ Añadir 1 mL de Etanol al 70% y mezclar en vortex.
- ✓ Introducir la barra magnética en el SM e incubar 2 minutos.
- ✓ Mezclar volteando el SM con los tubos varias veces.
- ✓ Incubar 1 minuto en el SM.
- ✓ Eliminar el sobrenadante.
- ✓ Incubar la muestra a temperatura ambiente 5 minutos.
- ✓ Eliminar el resto de sobrenadante y después sacar la barra magnética del SM.

Elución del RNA.

- ✓ Añadir 50 µl de la mezcla BB/ICR y resuspender pipeteando varias veces.
- ✓ Incubar los tubos con la tapa abierta, durante 20 minutos a 85°C en termobloque.
- ✓ Transferir los tubos al SM con la barra imantada e incubar 2 minutos.
- ✓ Transferir el sobrenadante (Solución de RNA purificado) a un nuevo tubo.
- ✓ Emplear 5 µl para la amplificación.

Una vez realizada la extracción de ARN, los siguientes pasos (amplificación mediante NASBA y detección mediante hibridación reversa) son comunes a la versión inicial de GTMD anteriormente descritos.

4.5. COBAS AMPLICOR MTB Assay. (F. Hoffman-La Roche Ltd. Basel, Switzerland)

COBAS AMPLICOR (CA) es un sistema completamente automatizado para la amplificación y detección de ácidos nucleicos. Consta de ocho elementos electromecánicos principales:

El termociclador que contiene dos segmentos de termociclación con capacidad para dos anillos de amplificación (24 tubos de amplificación). Las bandejas de reactivos (una para los reactivos genéricos y dos para los reactivos específicos). El mecanismo de transferencia que consiste en una aguja de pipeteo y transferencia de los tubos de detección. El módulo de incubación que mantiene una temperatura de 37°C, necesaria para las reacciones de hibridación y detección. La plataforma de tubos de detección, el módulo de lavado y el fotómetro para determinar la densidad óptica de los productos.

Se trata de una prueba cualitativa para la detección de microorganismos del *Complejo M. tuberculosis*, que se realizó a todas las muestras en paralelo con Genotype Mycobacteria Direct.

La técnica se divide en tres partes:

- Desactivación de las muestras clínicas y extracción del ADN de las micobacterias.
- Amplificación por PCR
- Hibridación del producto amplificado a sondas específicas y detección mediante detección colorimétrica.

⌘ **Desactivación y Extracción** de los especímenes clínicos:

- ✓ Preparar tantos tubos Sarstedt de 2 mL, con 500 µl de solución de lavado, como muestras tengamos.
- ✓ Añadir 100 µl de muestra descontaminada.
- ✓ Agitar en vortex.
- ✓ Centrifugar a 14.000 G durante 10 minutos.
- ✓ Desechar el sobrenadante.
- ✓ Añadir al pellet 100 µl de reactivo de lisis.
- ✓ Agitar en vortex.
- ✓ Incubar a 60°C en termobloque durante 45 minutos.
- ✓ Dar un pulso de centrifuga a las muestras durante 5 segundos.
- ✓ Añadir 100 µl de reactivo neutralizante.
- ✓ Agitar en vortex.

En este momento podemos utilizar el extraído para montar la PCR o podemos mantenerlo a 4°C durante 24h.

⌘ **Amplificación** mediante PCR:

- ✓ Preparar Master Mix para la reacción de PCR.
- ✓ Preparar anillo de reacción.
- ✓ Añadir a cada tubo de reacción 50 µl de **Master Mix**. Esta mezcla se caracteriza por contener: uracil-N-glucosilasa UNG (que provoca la degradación de amplicones contaminantes que contienen desoxiuridina), nucleótidos, Taq DNA polimerasa, primers específicos biotinilados y un control interno (IC).
- ✓ Añadir a cada tubo 50 µl de la mezcla neutralizada del extraído.
- ✓ Añadir un Control Positivo y un Control Negativo por cada anillo de reacción.
- ✓ Introducir el anillo de muestras en el analizador COBAS AMPLICOR y seleccionar el programa adecuado "MTB + MCC".

Después de la amplificación el analizador añade una solución de desnaturalización a los tubos. Se añaden alícuotas de amplicón desnaturalizado y una suspensión de partículas magnéticas revestidas con una sonda oligonucleótida específica del objetivo a pocillos de detección. A continuación se añade conjugado de avidina-peroxidasa de rábano, que se une al amplicón marcado con biotina. El analizador realiza una detección colorimétrica a 660 nm, tras añadir peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina a la mezcla. Una lectura de absorbancia mayor a 0,350 unidades de densidad óptica, considera positiva la presencia de ADN del MTBC.

Imagen 12. Analizador Cobas Amplicor

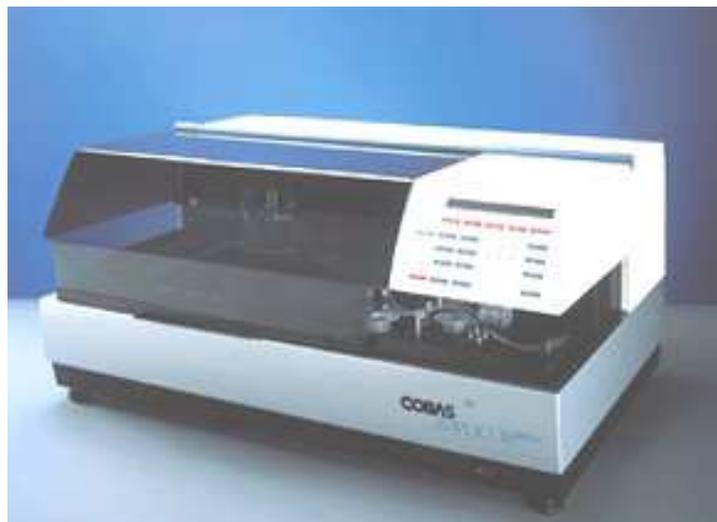


Imagen 13. Anillo de muestras para amplificación y detección en Cobas Amplicor

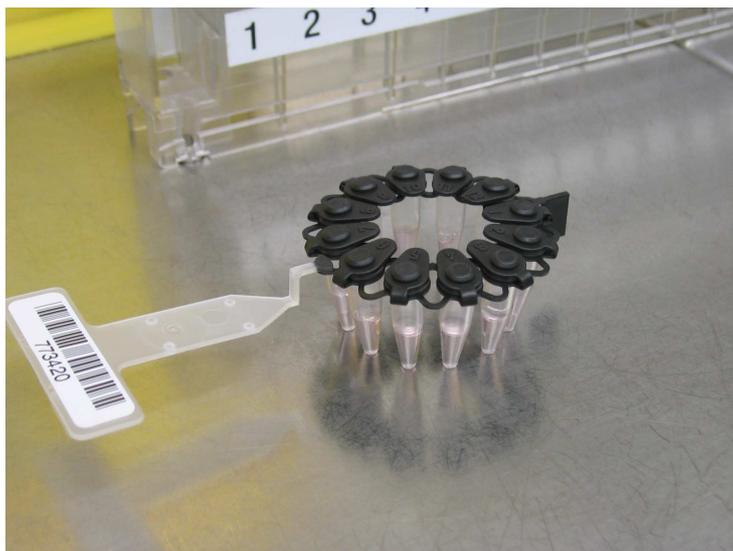


Imagen 14. Evaluación de resultados en Amplicor-MTB.

HOSP. UNIV. REINA SOFIA- CORDOBA-		15. 7. 2005.		LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA				
AMPLILINK 2.41 Report: Batch Result								
Batch	System ID	Comment						
A 7/15/05 - 842303	1							
T	T #	Order/Lot Number	Test	Result	Unit	Flags	Date/Time	A
S	1	* <unknown> Sample: 0.003	MTB	<u>NEG</u>	(0.003 OD)	-	7/15/05 10:38:43 PM	
S	1	* <unknown> Sample: *.***	MCC	POS	(*.*** OD)	-	7/15/05 11:38:42 PM	
S	2	* <unknown> Sample: 0.006	MTB	<u>NEG</u>	(0.006 OD)	-	7/15/05 10:39:55 PM	
S	2	* <unknown> Sample: *.***	MCC	POS	(*.*** OD)	-	7/15/05 11:39:54 PM	
S	3	* <unknown> Sample: *.***	MTB	POS	(*.*** OD)	-	7/15/05 10:41:07 PM	
S	4	* <unknown> Sample: *.***	MTB	POS	(*.*** OD)	-	7/15/05 10:42:19 PM	
S	5	* <unknown> Sample: *.***	MTB	POS	(*.*** OD)	-	7/15/05 10:43:30 PM	
S	6	* <unknown> Sample: *.***	MTB	POS	(*.*** OD)	-	7/15/05 10:44:43 PM	
S	7	* <unknown> Sample: *.***	MTB	POS	(*.*** OD)	-	7/15/05 10:45:54 PM	
S	8	* <unknown> Sample: *.***	MTB	POS	(*.*** OD)	-	7/15/05 10:47:06 PM	
S	9	* <unknown> Sample: *.***	MTB	POS	(*.*** OD)	-	7/15/05 10:48:18 PM	
S	10	* <unknown> Sample: 0.006	MTB	<u>NEG</u>	(0.006 OD)	-	7/15/05 10:49:31 PM	
S	10	* <unknown> Sample: *.***	MCC	POS	(*.*** OD)	-	7/15/05 11:49:30 PM	
S	11	* <unknown> Sample: 0.003	MTB	<u>NEG</u>	(0.003 OD)	-	7/15/05 10:50:43 PM	
S	11	* <unknown> Sample: *.***	MCC	POS	(*.*** OD)	-	7/15/05 11:50:42 PM	
1 / 2		PCR		7/18/05		AMPLILINK 2.41 (0243.0)		

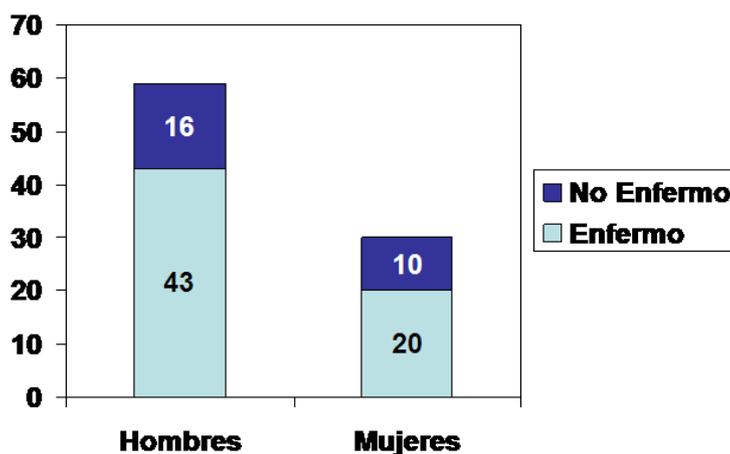
RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Características de los pacientes incluidos en el estudio.

Del total de 89 pacientes incluidos en el estudio, 59 (66,3%, IC 95% 55,5-76,0%) fueron hombres y 30 (33,7%, IC 95% 24,0-44,5%) fueron mujeres. De estos, fueron enfermos tuberculosos o padecieron algún tipo de micobacteriosis. 63 (70,8%, IC 95% 60,2-79,9%).

Gráfico 1. Distribución de la enfermedad de pacientes por sexo.



ENFERMEDAD

SEXO	E	N	TOTAL
H	43	16	59
% Fila	72,9	27,1	100,0
% Columna	68,3	61,5	66,3
M	20	10	30
% Fila	66,7	33,3	100,0
% Columna	31,7	38,5	33,7
TOTAL	63	26	89
% Fila	70,8	29,2	100,0
% Columna	100,0	100,0	100,0

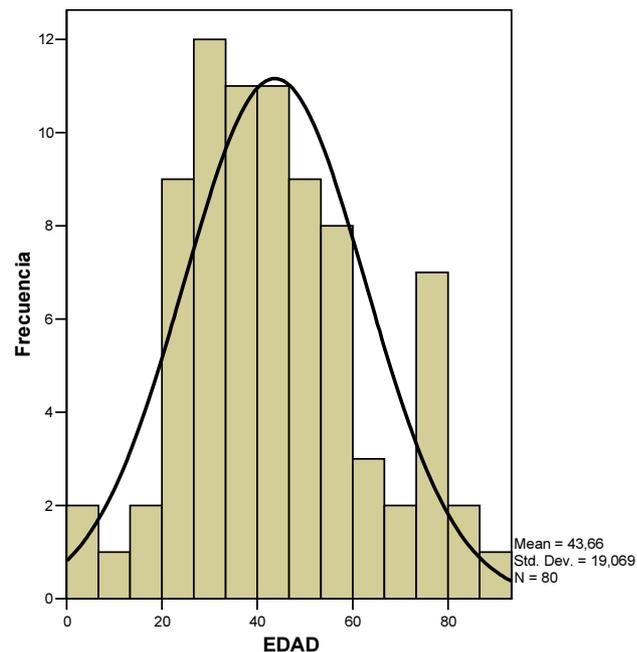
TEST ESTADÍSTICOS Chi cuadrado
Chi cuadrado: sin corregir 0,3714

Test exacto de Fisher 0,3549208962
P>0,05 (NS)

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los enfermos hombres (43, 72,9%) y mujeres (20, 66,7%).

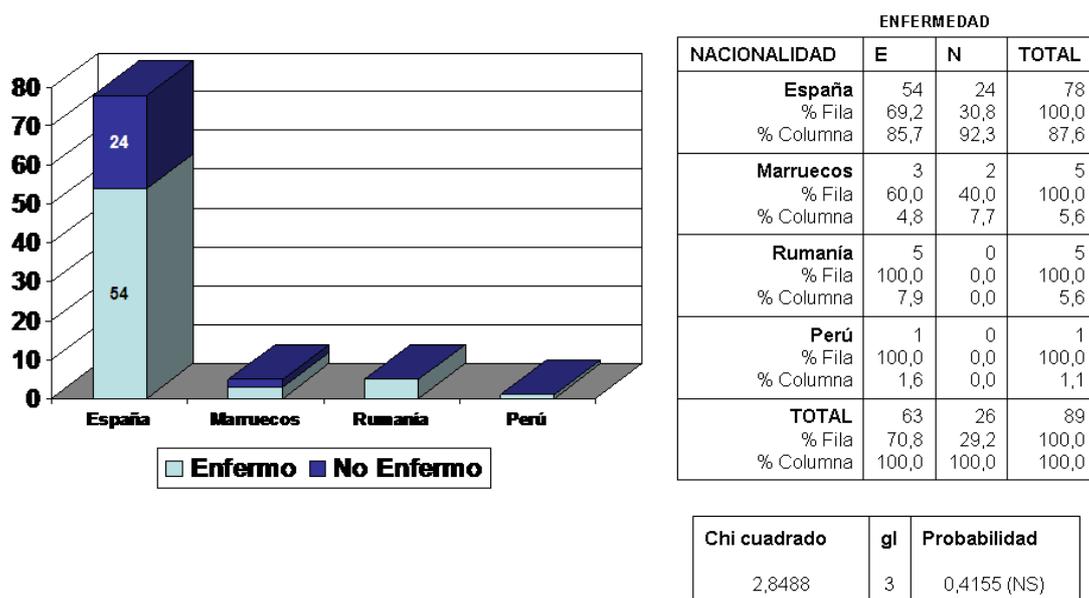
La edad media de los pacientes fue de 43,66 años (rango 4 - 89 años).

Gráfico 2. Distribución de la edad de los pacientes.



Del total de pacientes, 78 (87,6%) eran de nacionalidad española, el resto de pacientes procedían de Marruecos (5, 5,6%), Rumanía (5, 5,6%) y Perú (1, 1,1%). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los enfermos de distintas nacionalidades.

Gráfico 3. Distribución de la enfermedad según nacionalidad.



5.2. Procedencia y caracterización de las muestras incluidas en el estudio.

Las muestras clínicas incluidas en el estudio se dividen en dos grandes grupos: muestras pulmonares (respiratorias) y muestras extrapulmonares, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 13. Muestras clínicas respiratorias y extrapulmonares totales.

TIPO DE MUESTRA (respiratoria)	Nº de muestras	Porcentaje	Int. Conf.95%
Esputo	134	72%	65,0-78,4%
Broncoaspirado	5	2,7%	0,9-6,2%
Líquido pleural	5	2,7%	0,9-6,2%
Lavado bronco-alveolar	2	1,1%	0,1-3,8%
Total Respiratorias	146	78,5%	71,9-84,2%
TIPO DE MUESTRA (extrapulmonar)	Nº de muestras	Porcentaje	Int. Conf.95%
Biopsia	14	7,5%	4,2-12,3%
Heces	6	3,2%	1,2-6,9%
LCR	5	2,7%	0,9-6,2%
Orina	5	2,7%	0,9-6,2%
Exudado	4	2,2%	0,6-5,4%
Absceso	3	1,6%	0,3-4,6%
Líquido Ascítico	2	1,1%	0,1-3,8%
Suero	1	0,5%	0,0-3,0%
Total Extrapulmonares	40	21,5%	15,8-28,1%

Se procesaron un total de 146 muestras de origen respiratorio, y 40 muestras extrapulmonares, correspondiente al 78,5% y 21,5% del total respectivamente.

A continuación se exponen los resultados positivos a los distintos test de las muestras del estudio.

Tabla 14. Distribución de las muestras clínicas con microscopía positiva.

TIPO DE MUESTRA	Nº de muestras	BK+	Int. Conf.95%
Esputo	134	120 (90,9%)	84,7-95,2%
Broncoaspirado	5	1 (0,8%)	0,0-4,1%
Líquido pleural	5	-	-
BAL	2	1 (0,8%)	0,0-4,1%
<hr/>			
Biopsia	14	3 (2,3%)	0,5-6,5%
Heces	6	4 (3,0%)	0,8-7,6%
LCR	5	-	-
Orina	5	2 (1,5%)	0,2-5,4%
Exudado	4	1 (0,8%)	0,0-4,1%
Absceso	3	-	-
Líquido Ascítico	2	-	-
Suero	1	-	-
TOTAL	186	132 (71%)	63,9-77,4%

El 71% de las muestras incluidas en el estudio presentó la baciloscopia positiva.

Tabla 15. Distribución de las muestras clínicas con cultivo positivo.

TIPO DE MUESTRA	Nº de muestras	Cultivo+	Int. Conf.95%
Esputo	134	113 (81,9%)	0,2-5,1%
Broncoaspirado	5	3 (2,2%)	0,5-6,2%
Líquido pleural	5	2 (1,4%)	0,2-5,1%
BAL	2	2 (1,4%)	0,2-5,1%
<hr/>			
Biopsia	14	3 (2,2%)	0,5-6,2%
Heces	6	5 (3,6%)	1,2-8,3%
LCR	5	1 (0,7%)	0,0-4,0%
Orina	5	4 (2,9%)	0,8-7,3%
Exudado	4	3 (2,2%)	0,5-6,2%
Absceso	3	2 (1,4%)	0,2-5,1%
Líquido Ascítico	2	-	-
Suero	1	-	-
TOTAL	186	138 (74,2%)	67,3-80,3%

El 74,2% de las muestras incluidas en el estudio presentó cultivo positivo de micobacterias.

Tabla 16. Distribución de las muestras clínicas con GTMD positivo.

TIPO DE MUESTRA	Nº de muestras	GTMD+	Int. Conf.95%
Esputo	134	119 (88,1%)	81,5-93,1%
Broncoaspirado	5	2 (1,5%)	0,2-5,2%
Líquido pleural	5	-	-
BAL	2	1 (0,7%)	0,0-4,1%
Biopsia	14	4 (3,0%)	0,8-7,4%
Heces	6	4 (3,0%)	0,8-7,4%
LCR	5	1 (0,7%)	0,0-4,1%
Orina	5	1 (0,7%)	0,0-4,1%
Exudado	4	2 (1,5%)	0,2-5,2%
Absceso	3	1 (0,7%)	0,0-4,1%
Líquido Ascítico	2	-	-
Suero	1	-	-
TOTAL	186	135 (72,6%)	65,6-78,9%

Tabla 17. Distribución de las muestras clínicas con PCR positiva.

TIPO DE MUESTRA	Nº de muestras	PCR+	Int. Conf.95%
Esputo	134	119 (89,5%)	83,0-94,1%
Broncoaspirado	5	3 (2,3%)	0,5-6,5%
Líquido pleural	5	-	-
BAL	2	2 (1,5%)	0,2-5,3%
Biopsia	14	4 (3,0%)	0,8-7,5%
Heces	6	1 (0,8%)	0,0-4,1%
LCR	5	-	-
Orina	5	1 (0,8%)	0,0-4,1%
Exudado	4	2 (1,5%)	0,2-5,3%
Absceso	3	1 (0,8%)	0,0-4,1%
Líquido Ascítico	2	-	-
Suero	1	-	-
TOTAL	186	133 (71,5%)	64,4-77,9%

Las dos técnicas moleculares evaluadas en el estudio, GTMD y Amplicor, detectaron micobacterias en las muestras clínicas incluidas en el estudio en el 72,6% y el 71,5% respectivamente.

5.3. Relación entre Enfermedad y Resultados de: baciloscopia, cultivo, PCR y GTMD en muestras totales. Concordancia Clínica.

A continuación se muestra la concordancia que la variable “Enfermedad” ha tenido con las diferentes técnicas diagnósticas empleadas en el estudio. Previamente se ha empleado el test estadístico “Chi cuadrado de Mac Nemar. Se observan diferencias significativas con una $p < 0,001$.

Para expresar la concordancia clínica que presentan los resultados de los diferentes test diagnósticos se ha calculado el “Índice Kappa”.

Tabla 18: Relación estadística y concordancia clínica entre Enfermedad y las variables del estudio.

		Enfermedad		TEST ESTADÍSTICO (Chi cuadrado-Corrección Test exacto de Fisher)	Concordancia Clínica (Índice Kappa)
		Enfermo	No Enfermo		
BK	Positivo	131	1	$p < 0,001$	0,64
	Negativo	23	31		
CULTIVO	Positivo	137	1	$p < 0,001$	0,71
	Negativo	17	31		
PCR-MTB	Positivo	133	0	$p < 0,001$	0,68
	Negativo	21	32		
GMTD	Positivo	135	0	$p < 0,001$	0,71
	Negativo	19	32		

Se observa que hay una buena concordancia clínica entre la enfermedad tuberculosa y las diferentes técnicas diagnósticas. Genotype Mycobacteria Direct obtiene el mismo valor de Índice Kappa que el cultivo.

5.4. Relación entre GTMD y los resultados de: baciloscopia, cultivo y PCR en muestras totales. Concordancia clínica.

A continuación se muestra la concordancia que Genotype Mycobacteria Direct ha tenido con el resto de técnicas diagnósticas empleadas en el estudio. Se ha empleado el test estadístico “Chi cuadrado de Mac Nemar”. Se observan diferencias significativas con una $p < 0,001$.

Para expresar la concordancia clínica que presentan los resultados de los diferentes test diagnósticos se ha calculado el “Índice Kappa”.

Tabla 19: Relación estadística y concordancia clínica entre Genotype Mycobacteria Direct y las variables del estudio.

		GTMD		TEST ESTADÍSTICO (Chi cuadrado-Corrección Test exacto de Fisher)	Concordancia Clínica (Índice Kappa)
		GTMD Positivo	GTMD Negativo		
BK	Positivo	123	9	$p < 0,001$	0,72
	Negativo	12	42		
CULTIVO	Positivo	121	17	$p < 0,001$	0,57
	Negativo	14	34		
PCR-MTB	Positivo	121	12	$p < 0,001$	0,65
	Negativo	14	39		

El mayor grado de acuerdo se ha obtenido entre el resultado de GTMD y la baciloscopia.

5.5. Parámetros de validez de los test ensayados.

5.5.1. Genotype Mycobacteria Direct y Cobas Amplicor-MTB en muestras totales.

En la siguiente tabla se expresan los parámetros de validez de ambas técnicas moleculares, teniendo como resultado de referencia al cultivo de micobacterias.

A pesar de ello, se observa como el número de muestras que resultan con GTMD y PCR positiva y cultivo negativo, es elevado. Esto nos llevó a tener en cuenta como método de referencia, además del cultivo y la baciloscopia, también la clínica de los pacientes.

Tabla 20: Parámetros de validez entre GTMD y PCR-MTB frente al cultivo de micobacterias en muestras totales.

	CULTIVO		PARÁMETROS ESTADÍSTICOS			
	Positivo (n=138)	Negativo (n=48)	S (I.C. 95%)	E (I.C. 95%)	VPP (I.C. 95%)	VPN (I.C. 95%)
GTMD						
Positivo	121	14	88% (80,7-92,5%)	71% (55,7-82,6%)	90% (82,9-94,0%)	74% (52,0-78,9%)
Negativo	17	34				
PCR-MTB						
Positivo	117	16	85% (77,4-90,1%)	67% (51,5-79,2%)	88% (80,9-92,8%)	60% (46,0-73,2%)
Negativo	21	32				

La diferencia entre los porcentajes de sensibilidad entre ambas técnicas no resulta estadísticamente significativa con un valor de $p > 0,05$.

Prueba estadística <i>Chi cuadrado</i>	0,83
Grados de libertad	1
Valor de p	0,361 ($p > 0,05$) NS

5.5.2. Genotype Mycobacteria Direct y Cobas Amplicor-MTB en muestras de localización pulmonar.

GTMD y Amplicor-MTB, mostraron muy buenos resultados en las muestras de localización pulmonar, como se muestra en la siguiente tabla, aunque debemos tener en cuenta que aproximadamente el 92% de estas, presentaron baciloscopia positiva.

Tabla 21: Parámetros de validez entre GTMD y PCR-MTB frente al cultivo de micobacterias en muestras de localización pulmonar.

	CULTIVO		PARÁMETROS ESTADÍSTICOS			
	Positivo (n=120)	Negativo (n=26)	S (I.C. 95%)	E (I.C. 95%)	VPP (I.C. 95%)	VPN (I.C. 95%)
GTMD						
Positivo	110	12	92% (84,8-95,7%)	54% (33,7-72,9%)	90% (83,1-94,6%)	58% (36,9-77,2%)
Negativo	10	14				
PCR-MTB						
Positivo	111	13	92% (85,8-96,3%)	50% (30,4-69,6%)	90% (82,4-94,1%)	59% (36,7-78,5%)
Negativo	9	13				

5.5.3. Genotype Mycobacteria Direct y Cobas Amplicor-MTB en muestras de localización extrapulmonar.

Es en las muestras de origen extrapulmonar, donde encontramos mayores diferencias entre ambas técnicas, obteniendo resultados más favorables mediante GTMD. Como se observa en la siguiente tabla, la sensibilidad de GTMD casi duplica al de la PCR en este tipo de muestras.

Tabla 22: Parámetros de validez entre GTMD y PCR-MTB frente al cultivo de micobacterias en muestras de localización extrapulmonar.

	CULTIVO		PARÁMETROS ESTADÍSTICOS			
	Positivo (n=18)	Negativo (n=22)	S (I.C. 95%)	E (I.C. 95%)	VPP (I.C. 95%)	VPN (I.C. 95%)
GTMD						
Positivo	11	2	61% (36,1-81,7%)	91% (69,4-89,4%)	85% (53,7-97,3%)	74% (53,4-88,1%)
Negativo	7	20				
PCR-MTB						
Positivo	6	3	33% (36,1-81,7%)	86% (36,1-81,7%)	67% (30,9-91,0%)	61% (42,3-77,6%)
Negativo	12	19				

La diferencia entre los porcentajes de sensibilidad entre ambas técnicas resulta estadísticamente significativa con un valor de $p < 0,05$, a favor de GTMD.

Prueba estadística <i>Chi cuadrado</i>	6,08
Grados de libertad	1
Valor de p	0,013 ($p < 0,05$)NS

5.5.4. Genotype *Mycobacteria Direct* y *Cobas Amplicor-MTB* en la detección de *M. tuberculosis Complex*.

Amplicor-MTB se caracteriza por detectar exclusivamente a micobacterias del Complejo tuberculoso, que a diferencia de GTMD, es capaz de detectar además, a cuatro especies de micobacterias atípicas. De esta forma, para estudiar si se observaban diferencias significativas en la detección de *M. tuberculosis complex*, se han calculado los parámetros de validez excluyendo todas aquellas muestras en las que se aislaron micobacterias atípicas. Se han excluido todas aquellas muestras en las que se aislaron micobacterias atípicas, un total de 10.

Tabla 23: Parámetros de validez entre GTMD y PCR-MTB frente al cultivo de micobacterias en la detección de *M. tuberculosis Complex*.

	CULTIVO MTB		PARÁMETROS ESTADÍSTICOS			
	Positivo (n=128)	Negativo (n=48)	S (I.C. 95%)	E (I.C. 95%)	VPP (I.C. 95%)	VPN (I.C. 95%)
GTMD						
Positivo	113	14	88% (81,1-93,1%)	70,8% (55,7-82,6%)	89% (81,9-93,6%)	69% (54,4-81,3%)
Negativo	15	34				
PCR-MTB						
Positivo	117	16	91% (84,8-95,4%)	67% (51,5-79,2%)	88% (80,9-92,8%)	74% (58,5-86%)
Negativo	11	32				

La diferencia entre los porcentajes de sensibilidad entre ambas técnicas no resulta estadísticamente significativa con un valor de $p > 0,05$.

Prueba estadística <i>Chi cuadrado</i>	0,72
Grados de libertad	1
Valor de p	0,397 ($p > 0,05$) NS

5.5.5. Genotype Mycobacteria Direct en la detección de micobacterias atípicas.

Se trata de 10 muestras en las que se aislaron micobacterias atípicas, *Mycobacterium avium* (5), *M. intracellulare* (3), *M. kansasii* (1) y *M. malmoense* (1).

Tabla 24: Parámetros de validez entre GTMD frente al cultivo en la detección de micobacterias atípicas.

	CULTIVO M.A.		PARÁMETROS ESTADÍSTICOS			
	Positivo (n=10)	Negativo (n=0)	S (I.C. 95%)	E (I.C. 95%)	VPP (I.C. 95%)	VPN (I.C. 95%)
GTMD						
Positivo	8	0	80% (44,2-96,5%)	Vnd*	100% (59,8-100%)	0% (0,0-80,2%)
Negativo	2	0				

(*Vnd: Valor no definido.)

Genotype Mycobacteria Direct detectó todas las micobacterias atípicas que se aislaron en el estudio, salvo dos aislamientos de *Mycobacterium avium* que procedían de heces.

5.5.6. Genotype Mycobacteria Direct y Cobas Amplicor-MTB muestras con microscopía positiva.

GTMD y Amplicor-MTB muestran muy buenos resultados de sensibilidad en aquellas muestras que presentaron baciloscopia positiva, alcanzando el 95% y 91% respectivamente. Sin embargo presentan valores de especificidad muy bajos, al no ser el cultivo en este caso, un valor de referencia tan ajustado como el criterio de enfermedad.

Tabla 25: Parámetros de validez entre GTMD y PCR-MTB frente al cultivo de micobacterias en muestras con baciloscopia positiva.

	CULTIVO (n=132)		PARÁMETROS ESTADÍSTICOS			
	Positivo (n=117)	Negativo (n=15)	S (I.C. 95%)	E (I.C. 95%)	VPP (I.C. 95%)	VPN (I.C. 95%)
GTMD						
Positivo	111	12	95% (88,7-97,9%)	20% (5,3-48,6%)	90% (83,2-94,6%)	33% (9-69,1%)
Negativo	6	3				
PCR-MTB						
Positivo	106	13	91% (83,4-95,0%)	13% (2,3-41,6%)	89% (81,7-93,8%)	15% (2,7-46,3%)
Negativo	11	2				

La diferencia entre los porcentajes de sensibilidad entre ambas técnicas no resulta estadísticamente significativa con un valor de $p > 0,05$.

Prueba estadística <i>Chi cuadrado</i>	1,42
Grados de libertad	1
Valor de p	0,233 ($p > 0,05$) NS

Una de las muestras seleccionadas como BK+, presentó cultivo negativo y técnicas de amplificación de ácidos nucleicos negativo. Lo consideramos un falso negativo de la microscopía.

5.5.7. Genotype Mycobacteria Direct y Cobas Amplicor-MTB en muestras con microscopía negativa.

Tabla 26: Parámetros de validez entre GTMD y PCR-MTB frente al cultivo de micobacterias en muestras con baciloscopia negativa.

	CULTIVO (n=54)		PARÁMETROS ESTADÍSTICOS			
	Positivo (n=21)	Negativo (n=33)	S (I.C. 95%)	E (I.C. 95%)	VPP (I.C. 95%)	VPN (I.C. 95%)
GTMD						
Positivo	10	2	48% (26,4-69,7%)	94% (78,4-98,9%)	83% (50,9-97,1%)	74% (57,7-85,6%)
Negativo	11	31				
PCR-MTB						
Positivo	11	3	52% (30,3-73,6%)	91% (74,5-97,6%)	79% (48,8-94,3%)	75% (58,5-86,8%)
Negativo	10	30				

La diferencia entre los porcentajes de sensibilidad entre ambas técnicas no resulta estadísticamente significativa con un valor de $p > 0,05$.

Prueba estadística <i>Chi cuadrado</i>	0,15
Grados de libertad	1
Valor de p	0,700 ($p > 0,05$) NS

5.5.8. Genotype Mycobacteria Direct tras el Análisis de las discrepancias de los resultados.

Expresamos en este apartado las discrepancias encontradas en el estudio, es decir, resultados de GTMD y PCR-MTB positivos, pero con cultivo negativo. En este caso se consideró un verdadero positivo para las técnicas de amplificación, cuando los pacientes eran sospechosos de padecer tuberculosis pulmonar activa tras una revisión de la historia clínica, respondieron al tratamiento antituberculoso o tuvieron otros cultivos positivos para *M. tuberculosis Complex* o micobacteria atípica en el periodo de estudio. De manera, que hemos considerado como referencia o “Gold Standard” al paciente enfermo de tuberculosis o de cualquier otro tipo de micobacteriosis, en lugar del cultivo de micobacterias.

En este caso hemos obtenido unos valores de sensibilidad ligeramente inferiores, para ambas técnicas, sin embargo se ha alcanzado el 100% de especificidad y valor predictivo positivo, como puede observarse en la siguiente tabla.

Tabla 27: Parámetros de validez entre GTMD y PCR-MTB frente a criterios de enfermedad clínica en muestras totales.

	Pacientes		PARÁMETROS ESTADÍSTICOS			
	Enfermos tuberculosos N=154	Sin enfermedad N=32	S (I.C. 95%)	E (I.C. 95%)	VPP (I.C. 95%)	VPN (I.C. 95%)
GTMD						
Positivo	135	0	88% (81,2-92,2%)	100% (86,7-100%)	100% (96,7-100%)	63% (48,1-75,5%)
Negativo	19	32				
PCR-MTB						
Positivo	133	0	86% (79,7-91,2%)	100% (86,7-100%)	100% (96,7-100%)	60% (46,0-73,2%)
Negativo	21	32				

La diferencia entre los porcentajes de sensibilidad entre ambas técnicas no resulta estadísticamente significativa con un valor de $p > 0,05$.

Prueba estadística <i>Chi cuadrado</i>	0,38
Grados de libertad	1
Valor de p	0,536 (p>0,05) NS

A continuación se analizan caso a caso todas las muestras, que aunque son de pacientes enfermos, han sido GTMD negativos.

Tabla 28: Muestras con resultados discordantes entre GTMD y cultivo-enfermedad.

Nº	Paciente	Muestra	BK	CULTIVO	GTMD	PCR	Observaciones
1	AALA	ESPUTO	20 BAAR/100	P	NEGATIVO	POSITIVO	MTB-DR tratada
2	ALA	ESPUTO	5 BAAR/100	P	NEGATIVO	POSITIVO	-
3	ALJL	L. PLEURAL	N	P	NEGATIVO	NEGATIVO	M. Paubacilar
4	CHJ	ESPUTO	3 BAAR/100	N	NEGATIVO	POSITIVO	Escape bacilar
5	CHJ	ESPUTO	100BAAR/1	N	NEGATIVO	POSITIVO	Escape bacilar
6	CXEC	HECES	N	PA	NEGATIVO	NEGATIVO	M. Paubacilar
7	CXEC	HECES	N	PA	NEGATIVO	NEGATIVO	M. Paubacilar
8	DGF	ESPUTO	N	P	NEGATIVO	POSITIVO	M. Paubacilar
9	LAE	BIOPSIA	N	N	NEGATIVO	POSITIVO	En tratamiento
10	LHJA	ESPUTO	4 BAAR/100	P	NEGATIVO	POSITIVO	-
11	MBB	ORINA	10 BAAR/100	P	NEGATIVO	POSITIVO	-
12	MJDY	L. PLEURAL	N	P	NEGATIVO	NEGATIVO	M. Paubacilar
13	MMJ	ORINA	N	P	NEGATIVO	NEGATIVO	M. Paubacilar
14	MMJ	ORINA	N	P	NEGATIVO	NEGATIVO	M. Paubacilar
15	RTA	ESPUTO	50 BAAR/100	P	NEGATIVO	POSITIVO	-
16	SCD	ABSCESO	N	P	NEGATIVO	NEGATIVO	Inhibidores
17	SMA	BAS	N	P	NEGATIVO	POSITIVO	M. Paubacilar
18	TTMD	BAL	N	P	NEGATIVO	POSITIVO	M. Paubacilar
19	VMAM	ESPUTO	1 BAAR/100	P	NEGATIVO	POSITIVO	-

*(PA): cultivo positivo para micobacterias atípicas. (P): cultivo positivo, (-) Situación normal.

Un aspecto diferencial que presenta GTMD, con respecto a la PCR es que su diana de amplificación es el ARNr. Por tanto, poblaciones de micobacterias de pacientes que han estado en tratamiento, no son detectables mediante GTMD, sin embargo sí lo serán mediante PCR. Hay controversia con este tema, ya que hay publicaciones que defienden esta posición, y sin embargo otras

publicaciones demuestran la presencia de ARNm en muestras de pacientes que han sido tratados^(99, 100).

Dentro de este grupo de muestras con GTMD negativo, hemos encontrado diferentes situaciones; la más común, son aquellas muestras paubacilares, con baciloscopia negativa, en las que las micobacterias, no han podido ser detectadas mediante GTMD. Muestras de pacientes que se encontraban en tratamiento previo, antes de realizar GTMD y también muestras en las que se detectaron inhibidores de la amplificación.

5.5.9. Baciloscopia y Cultivo tras el Análisis de las discrepancias en los resultados.

Tabla 29: Parámetros de validez entre la baciloscopia y el cultivo frente a criterios de enfermedad clínica en muestras totales.

	Pacientes		PARÁMETROS ESTADÍSTICOS			
	Enfermos tuberculosos N=154	Sin enfermedad N=32	S (I.C. 95%)	E (I.C. 95%)	VPP (I.C. 95%)	VPN (I.C. 95%)
BACILOSCOPIA						
Positivo	131	1	85% (78,2-90,1%)	97% (82,0-99,8%)	99% (95,2-100%)	57% (43,3-70,5%)
Negativo	23	31				
CULTIVO						
Positivo	137	1	89% (82,7-93,2%)	97% (82,0-99,8%)	99% (95,4-100%)	65% (49,4-77,4%)
Negativo	17	31				

La diferencia entre los porcentajes de sensibilidad entre ambas técnicas no resulta estadísticamente significativa con un valor de $p > 0,05$.

Prueba estadística <i>Chi cuadrado</i>	1,53
Grados de libertad	1
Valor de p	0,215 ($p > 0,05$)

5.6. Límites de detección de ARNr de *M. tuberculosis Complex* mediante GTMD.

Para calcular el límite de sensibilidad de la técnica utilizamos un 1 mL de muestra clínica control (con baciloscopia y cultivos negativos), a la cual se le adicionaron micobacterias procedentes de un cultivo puro de la cepa tipo H37Rv, hasta conseguir una suspensión con una concentración de 0,5 Mcfarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL)⁽¹⁰¹⁾. De esta suspensión inicial se realizaron sucesivas diluciones hasta alcanzar una concentración teórica aproximada de 6 UFC/mL de *M. tuberculosis Complex*.

A continuación se realizó GMTD de las últimas cinco diluciones que correspondían de manera aproximada a las siguientes concentraciones de *M. tuberculosis Complex* en la muestra: dilución 20 (190 UFC/mL), dilución 21 (95,3 UFC/mL), dilución 22 (47,6 UFC/mL), dilución 23 (23,8 UFC/mL), dilución (23,8 UFC/mL), dilución 24 (11,9 UFC/mL) y dilución 25 (5,9 UFC/mL).

Tabla 30: Sensibilidad de GTMD en muestras con concentraciones de *M. tuberculosis Complex* conocidas.

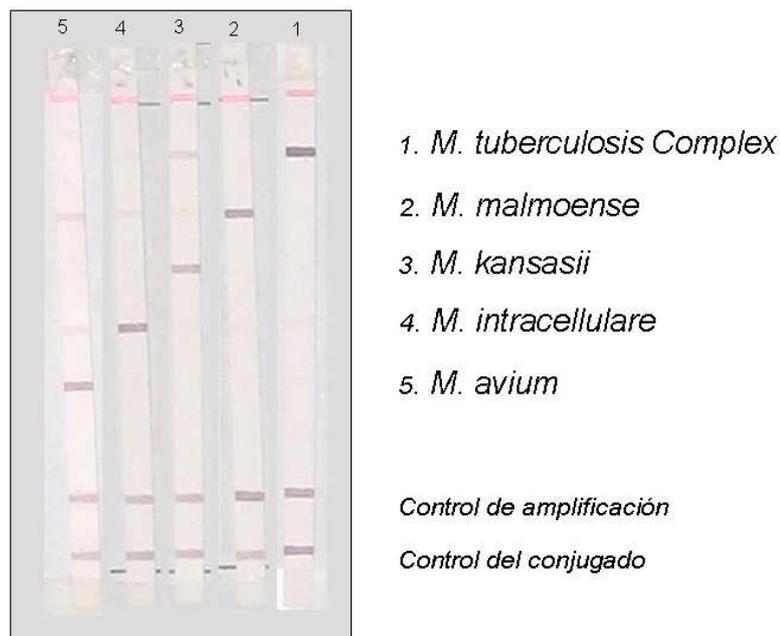
Dilución	Concentración	Resultado GTMD
20	190 UFC/mL	Positivo
21	95,3 UFC/mL	Positivo
22	47,6 UFC/mL	Positivo
23	23,8 UFC/mL	Positivo
24	11,9 UFC/mL	Positivo
25	5,9 UFC/mL	Positivo

5.8. Visualización de resultados de Genotype *Mycobacteria Direct*.

En la siguiente imagen, puede observarse los resultados que se obtienen después de la realización de GTMD.

Cada tira de identificación corresponde a cada una de las especies que GTMD nos permite identificar directamente de las muestras clínicas. Se observan las bandas de identificación según la especie de micobacteria, la banda de control de amplificación, y la banda de control de conjugado.

Imagen 15. Resultados obtenidos mediante GTMD, en muestras clínicas, durante el estudio.



5.9. Genotype Mycobacteria Direct en la detección de infecciones mixtas.

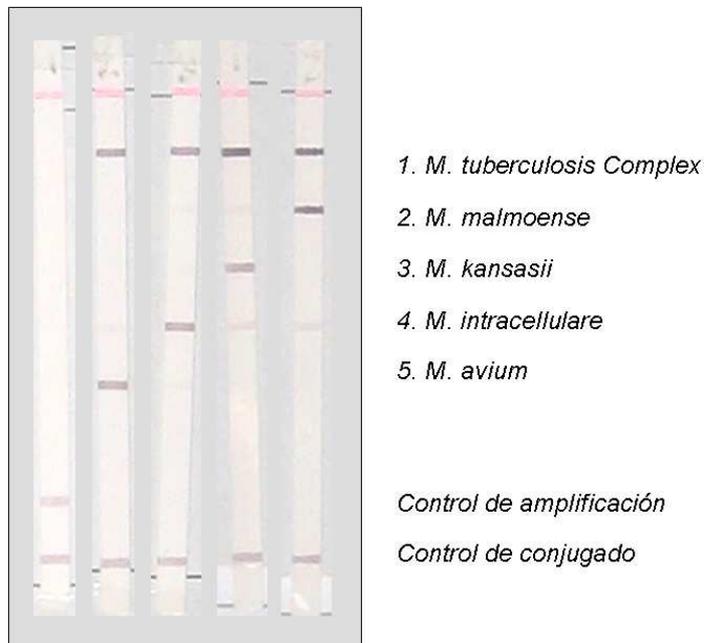
Nos propusimos determinar la capacidad de Genotype Mycobacteria Direct, en la detección de infecciones mixtas, es decir, aquellas causadas por más de una especie de micobacteria. Para ello, empleamos muestras clínicas control (con baciloscopia y cultivos negativos) a las que se adicionó una suspensión de micobacterias procedentes de cultivos tipo, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 31. Cepas ATCC de micobacterias empleadas en la validación de Genotype Mycobacteria Direct.

Cepa ATCC	Especie
25618	<i>M. tuberculosis Complex</i>
23070	<i>M. avium</i>
13209	<i>M. intracellulare</i>
12478	<i>M. kansasii</i>
29571	<i>M. malmoense</i>

Tabla 32. Muestras control empleadas para la detección de infecciones mixtas mediante Genotype Mycobacteria Direct.

Muestra	Especies
1	<i>M. tuberculosis Complex</i>
2	<i>M. tuberculosis Complex + M. avium</i>
3	<i>M. tuberculosis Complex + M. kansasii</i>
4	<i>M. tuberculosis Complex + M. intracellulare</i>
5	<i>M. tuberculosis Complex + M. malmoense</i>

Imagen 16. Genotype Mycobacteria Direct en la detección de infecciones mixtas.

Se observa en la imagen como GTMD es capaz de detectar ARNr de dos especies diferentes en la misma muestra. Además se observa, como en las muestras con una alta carga de ARN diana, no se aprecia la amplificación del control interno.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Actualmente la tuberculosis se ha convertido en una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Según la OMS, cada segundo se produce en el mundo una nueva infección por el bacilo de la tuberculosis. Un tercio de la población mundial está actualmente infectada, y entre el 5% y el 10% de las personas infectadas desarrollarán la enfermedad o pasarán a ser contagiosas en el transcurso de su vida.^(102, 103)

España, es el segundo país de Europa, con las mayores tasas de infección por tuberculosis. En nuestro país, se registran cada año entre 11.000 a 15.000 nuevos casos de tuberculosis declarados, situando a nuestro país en el segundo lugar de la Unión Europea en número de contagios de esta enfermedad, por detrás de Portugal.^(40-42, 104)

En el plan mundial para detener la tuberculosis, propuesto por la OMS^(105, 106), se abarcan seis puntos principales, para conseguir este objetivo:

1. Ampliación y perfeccionamiento del tratamiento DOTS de alta calidad.
2. Afrontar la combinación de tuberculosis y VIH, la tuberculosis polifarmacorresistente y otros retos.
3. Contribuir al fortalecimiento de los sistemas de salud.
4. Colaborar con todos los dispensadores de atención.
5. Potenciar la capacidad de acción de los enfermos de tuberculosis y de las comunidades.
6. Fomentar y promover las investigaciones.

En este último punto, se destaca que *“si bien los instrumentos actuales permiten luchar contra la tuberculosis, el perfeccionamiento de las prácticas y la eliminación de esta enfermedad dependerán de las innovaciones en materia de métodos de diagnóstico, medicamentos y vacunas”*.

Si una persona enferma de tuberculosis pulmonar activa, no recibe tratamiento, puede infectar a una media de entre 10 y 15 personas en un año. De manera que el diagnóstico rápido y preciso de los enfermos tuberculosos, es uno de los principales puntos, en la lucha contra la enfermedad. Además de ser el principal criterio para adoptar las medidas terapéuticas correspondientes y así evitar la transmisión de la enfermedad.

El diagnóstico de la tuberculosis pulmonar está basado en los hallazgos clínicos del paciente como la tos persistente, la fiebre, escalofríos, sudoración nocturna y pérdida de peso entre otros, aunque estos suelen ser síntomas comunes a otras enfermedades, de manera que son la radiología, la anatomía patológica y la microbiología fundamentalmente, los que ayudan de manera decisiva a diagnosticar a esta enfermedad conocida en el ámbito de la medicina como la “*gran simuladora*”. Sin embargo la microbiología es fundamental ya que, además de la detección de los bacilos en la muestra, mediante microscopía o microbiología molecular, permite el aislamiento del agente causal en el cultivo y su posterior identificación, que sigue siendo la clave del diagnóstico definitivo de la tuberculosis. Además, permite la determinación de pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antimicobacterianos, más frecuentemente utilizados.

El diagnóstico microbiológico de la tuberculosis y de cualquier otro tipo de micobacteriosis está basado en la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en las muestras clínicas mediante microscopía y su aislamiento en medios de cultivo específicos, como métodos de referencia.

El examen microscópico de las muestras, se realiza después de un procesamiento adecuado de las mismas (concentración y descontaminación) y nos permite la visualización mediante microscopía óptica normal o de fluorescencia la detección de los bacilos tuberculosos en la muestra, en pocas horas después de la recepción de las muestras en el laboratorio de microbiología. Es una técnica que se caracteriza por ser fácil de realizar, rápida y de muy bajo coste. La sensibilidad de la microscopía se estima entre el 60-70%, ya que depende de factores como el tipo de muestra, su

procesamiento previo, la técnica de tinción realizada, el tipo de microscopía utilizada y la experiencia del observador. Esta sensibilidad es la que se estima cuando se trata a la muestra con auramina y se utiliza el microscopio de fluorescencia. De esta forma pueden detectarse bacilos, cuando su concentración en la muestra oscila los 10.000 BAAR/mL. Esta sensibilidad podría ser aceptable en la tuberculosis pulmonar activa, donde el número de bacilos en la muestra suele ser elevado, pero no lo es en el caso de micobacteriosis extrapulmonar y en las formas paubacilares de la enfermedad (meningitis tuberculosa o tuberculosis renal). De esta forma, el diagnóstico definitivo de la enfermedad, requiere del aislamiento de las micobacterias en cultivos específicos.^(107, 108)

El cultivo tradicional de las muestras en micobacteriología se realiza fundamentalmente en medios sólidos como el *Löwenstein-Jensen* y líquidos como el *Middlebrook 7H9*, *7H10* y *7H11*; aunque también posee sus limitaciones, tales como la lentitud, siendo necesarios entre 3 y 5 semanas para detectar el crecimiento de las colonias en medio sólido. Aunque este tiempo se ha podido reducir a periodos de entre 7 a 20 días, con la incorporación de los medios líquidos de crecimiento que se incorporan en sistemas de detección automática de crecimiento.^(109, 110)

Una vez detectada la presencia de micobacterias en la muestra, la instauración del tratamiento debe realizarse de la forma, más rápida y precoz posible. De manera que el tratamiento suele realizarse en un principio de forma empírica, ya que no se conoce la sensibilidad de la cepa implicada en el proceso, antes de la aplicación del mismo.

La tuberculosis pulmonar constituye el 75% de todas las formas de tuberculosis, y es la que contribuye de forma fundamental a la transmisión y por tanto al mantenimiento de la enfermedad tuberculosa. Su tratamiento debe de considerarse con un doble objetivo: la curación del enfermo y la interrupción de la cadena de transmisión de la enfermedad tuberculosa.⁽¹¹¹⁾

El tratamiento farmacológico de la tuberculosis pretende conseguir la negativización de los cultivos en el menor tiempo posible, prevenir la aparición de resistencias, y asegurar la curación completa sin recaídas. Para conseguir con éxito este objetivo, una de los principios fundamentales en el tratamiento de la tuberculosis pulmonar es el uso de diversos fármacos a la vez. Es por ello que la pauta terapéutica de elección sea el tratamiento durante seis meses, con rifampicina(R), isoniazida(H) y pirazinamida(Z), siguiendo el esquema (2 RHZ / 4 RH).⁽¹¹¹⁻¹¹⁴⁾

El cumplimiento y la adherencia del tratamiento por parte del enfermo es fundamental en el éxito de la terapia antituberculosa, sobretodo en tratamientos tan prolongados como este, que llegan a durar un mínimo de 6 meses. Para evitar que los pacientes abandonen la terapia al experimentar una mejoría clínica, la OMS puso en marcha en el año 1991 un programa de terapia directamente observada (DOT).⁽¹¹⁵⁾ Uno de los pilares de este programa es que el personal sanitario se encargara de la distribución de la medicación y se asegurara de la toma del mismo por parte del paciente. Desde entonces diferentes estudios han demostrado como los pacientes que se encontraban dentro de estos programas DOT, han presentado mayor adherencia al tratamiento y unas mayores tasas de curación.⁽¹¹⁶⁻¹¹⁹⁾

Una de las metas planteadas por la Organización Mundial de la Salud y el “*Plan de Estrategia Alto a la Tuberculosis*” es haber disminuido en el 2015 al 50% respecto a 1990 la prevalencia de tuberculosis, y en el 2050 eliminar la tuberculosis como problema de salud pública.^(115, 120)

De manera que un diagnóstico rápido de la tuberculosis es uno de los factores importantes para el control de la enfermedad a nivel de salud pública, ya que al poder detectar de forma rápida y eficaz a los enfermos tuberculosos, se podrá evitar la transmisión de la enfermedad entre la población.

En los últimos años el desarrollo tecnológico ha permitido que numerosos métodos moleculares hayan sido desarrollados para el diagnóstico y la identificación de micobacterias en muestras clínicas ^(53-55, 121). Estos

métodos son capaces de reducir el tiempo de diagnóstico de semanas a días, y por ello cada vez más están alcanzando una mayor importancia y relevancia en el campo del diagnóstico micobacteriológico (57, 122, 123).

Desde el descubrimiento de la PCR en 1986^(124, 125) se ha producido una carrera en el desarrollo de este tipo de técnicas por parte de diferentes compañías que a lo largo de este tiempo han desarrollado diferentes estrategias para conseguir el mismo objetivo, que es la amplificación de ADN o ARN diana y su posterior detección. De estos sistemas de detección comercializados, los que actualmente se utilizan en los laboratorios de microbiología son los siguientes:

COBAS AMPLICOR MTB (F. Hoffman-La Roche Ltd. Basel, Switzerland) basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La prueba usa iniciadores biotinilados específicos de una secuencia de aproximadamente 584 nucleótidos dentro de la región que codifica para el ARNr 16S. La prueba permite la amplificación simultánea del ADN objetivo del *Complejo M. tuberculosis* y el ADN del control interno, mediante la utilización de dos primers específicos, uno para el control interno y otro para la secuencia diana de MTBC.⁽¹²⁶⁾

AMTD2 (Amplified *M. tuberculosis* Direct Assay®, GenProbe, San Diego, CA) se fundamenta en la amplificación mediada por transcripción (TMA), desarrollada por Kwoh y colaboradores y en la *técnica de protección de la hibridación* (HPA) para la detección cualitativa de un fragmento de ARNr 16S específico de *M.tuberculosis Complex*.^(127, 128)

BDProbeTEC ET (Becton Dickinson). Se trata de una técnica semiautomatizada en la que se amplifica de forma simultánea e isotérmica un fragmento del elemento repetitivo en el genoma micobacteriano, IS6110, específico de *M. tuberculosis Complex*, junto con un fragmento del gen ARNr 16S común a todos los miembros del género *Mycobacterium*. Se utiliza la denominada Amplificación por Desplazamiento de Bandas (Strand

Displacement Amplification, SDA) y un sistema de detección a tiempo real de los amplicones producidos.⁽¹²⁹⁾

INNO-LiPA RIF-TB, consiste en una amplificación mediante *nested-PCR* de una región de 70 pb del gen *rpoB* que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa presente en todos los miembros del complejo *M. tuberculosis*, seguida de una hibridación reversa. El sistema LiPA sirve para detectar el complejo *M. tuberculosis* y, a la vez, la resistencia a la rifampicina.⁽¹³⁰⁾

Y por último *GENOTYPE MYCOBACTERIA DIRECT* (Hain Lifescience GMBH Nehren, Germany), que se fundamenta en las tecnologías NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) y DNA-STRIPS® que nos permite mediante la amplificación de 23S ARNr, la detección de *M. tuberculosis* Complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, y *M. malmoense* directamente de los especímenes clínicos descontaminados.⁽⁸³⁾

Tabla 33: Principales características de las diferentes técnicas de microbiología molecular para la detección de *M. tuberculosis* Complex y micobacterias atípicas directamente de la muestra clínica.

Técnica	Tipo de muestra	Diana	Método de amplificación	Especies	Método de detección	Duración
Genotype <i>Mycobacteria Direct</i>	R/E	ARNr 23 S	NASBA	<i>M. tuberculosis</i> Complex	Hibridación reversa	3-4 h.
				<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. malmoense</i>		
Amplicor MTB	R	ARNr 16S	PCR	<i>M. tuberculosis</i> Complex	Espectrofotometría	5-6 h.
				<i>M. avium</i> * <i>M. intracellulare</i> *		
AMTD2	R	ARNr 16S	AMT ^a	<i>M. tuberculosis</i> Complex	Quimioluminiscencia	3-4 h.
BDProbeTEC ET	R	IS6110	SDA	<i>M. tuberculosis</i> Complex	Tiempo real	3-4 h.
INNO-LiPA RIF-TB	R	rpoB	nestedPCR	<i>M. tuberculosis</i> Complex	Hibridación reversa	12h.
LCx MTB^b	R	Gen antígeno B	LCR ^c	<i>M. tuberculosis</i> Complex	Fluorimetría	5-6h.

(a): Amplificación mediada por transcripción.

(b): Técnica actualmente no comercializada.

(c): Reacción en cadena de la ligasa

(*) : Necesitan diferentes sondas de detección según la especie.

A lo largo de este tiempo, se han realizado numerosos estudios cuyo propósito ha sido la evaluación de las técnicas moleculares más importantes aplicadas al diagnóstico de la tuberculosis. A continuación se exponen en diferentes tablas los principales estudios que se han realizado en los últimos diez años:

Tabla 34: Evaluación de AMPLICOR (PCR) en la detección de M. tuberculosis Complex en muestras clínicas.

Estudio (Referencia)	Número de muestras	Cultivos positivos/ microscopía positiva	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	Sensibilidad (%) para:	
							Muestras con Microscopía positiva	Muestras con Microscopía negativa
Mitarai y cols. ⁽¹³¹⁾	75 (E)	22/4	27	98	-	-	100	17
Gomez-Pastrana y cols. ⁽¹³²⁾	251 (E + R)	21/6	44	94	73	81	-	-
Rajalahti y cols. ⁽¹³³⁾	324 (R)	76/51	83	99	97	95	90	68
Eing y cols. ⁽¹³⁴⁾	1527 (R + E)	65/32	66	99	94	98	87	56
Reischl y cols. ⁽¹³⁵⁾	643 (R) 506 (E)	56/44 39/25	84 82	99	-	-	95 100	50 61
Rimek y cols. ⁽¹³⁶⁾	43 (E)	15/2	45	91	-	-	-	-
Bogard y cols. ⁽¹³⁷⁾	5077 (R)	333/249	85	99	96	98	96	72
Shah y cols. ⁽¹³⁸⁾	1090 (E)	32/10	76	99	92	99	90	71
Gamboa y cols. ⁽¹³⁹⁾	755 (R)	223/176	92	100	100	96	100	59
*Cohen y cols. ⁽¹⁴⁰⁾	85 (R)	27/12	74	93	-	-	10	53
*Al Zahrani y cols. ⁽¹⁴¹⁾	487 (R)	44/10	42	100	-	-	-	-
*Bonington y cols. ⁽¹⁴²⁾	35 (E)	3/3	29	100	100	54	-	-

(*) Evaluación clínica de Amplicor basada en la clínica del paciente. (R) muestras respiratorias. (E) Muestras extrapulmonares. (S) Sensibilidad. (E) Especificidad. (VPP) Valor predictivo positivo. (VPN) Valor predictivo negativo.

Tabla 35: Evaluación de AMTD2 en la detección de M. tuberculosis Complex en muestras clínicas.

Estudio (Referencia)	Número de muestras	Cultivos positivos/ microscopía positiva	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	Sensibilidad (%) para:	
							Muestras con Microscopía positiva	Muestras con Microscopía negativa
Gamboa y cols. ⁽¹⁴³⁾	410 (R)	95/48	95	100	100	98	100	83
	272 (E)	68/21	87	100	100	98	100	89
Woods y cols. ⁽¹⁴⁴⁾	175 (E)	23/21	89	100	100	98	-	-
O`Sullivan y cols. ⁽¹⁴⁵⁾	391 (R)	46/30	98	99	94	99	100	75
	164 (E)	22/9	77	98	92	96	90	64
Alcalá y cols. ⁽¹⁴⁶⁾	663 (R)	115/79	91	93	74	98	97	77
	238 (E)	33/13	89	92	66	98	92	87
Chedore y Jamieson. ⁽¹⁴⁷⁾	823 (R+E)	245/230	100	99	97	100	100	100
Chedore y Jamieson. ⁽¹⁴⁸⁾	311 (E)	21/10	94	99	88	99	-	-
*Catanzaro y cols. ⁽¹⁴⁹⁾	338 (R)	65/43	83	97	88	95	-	-
*Bergmann y cols. ⁽¹⁵⁰⁾	486 (R)	22/10	91	99	83	99	100	83

(*) Evaluación clínica de AMTD2 basada en la clínica del paciente. (R) muestras respiratorias. (E) Muestras extrapulmonares. (S) Sensibilidad. (E) Especificidad. (VPP) Valor predictivo positivo. (VPN) Valor predictivo negativo.

Tabla 36: Evaluación de BD Probe Tec en la detección de M. tuberculosis Complex en muestras clínicas.

Estudio (Referencia)	Número de muestras	Cultivos positivos/ microscopía positiva	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	Sensibilidad (%) para:	
							Muestras con Microscopía positiva	Muestras con Microscopía negativa
Bergmann y Woods. ⁽⁶⁹⁾	523 (R)	24/15	100	99	85	100	100	100
Pfyffer y cols. ⁽⁷⁰⁾	799 (R)	41/28	98	96	64	99	100	92
Bergmann y cols. ⁽⁶⁸⁾	600 (R)	16/12	94	99	94	99	100	75
Johansen y cols. ⁽¹⁵¹⁾	351 (R) 372 (E)	150/85 192/67	83 60	99 99	-	-	100 98	60 40
Barret y cols. ⁽¹⁵²⁾	200 (R)	104/101	97	96	97	96	99	33
Maugein y cols. ⁽¹⁵³⁾	547 (R) 74 (E)	69/43 8/4	89	98	88	98	100 100	76 86
Mazzareli y cols. ⁽¹⁵⁴⁾	537 (R) 294 (E)	184/135 68/28	91 78	98 98	-	-	99 90	71 69

(R) muestras respiratorias. (E) Muestras extrapulmonares. (S) Sensibilidad. (E) Especificidad. (VPP) Valor predictivo positivo. (VPN) Valor predictivo negativo.

Tabla 37: Evaluación de LCx en la detección de M. tuberculosis Complex en muestras clínicas.

Estudio (Referencia)	Número de muestras	Cultivos positivos/ microscopía positiva	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	Sensibilidad (%) para:	
							Muestras con Microscopía positiva	Muestras con Microscopía negativa
Alonso y cols. ⁽¹⁵⁵⁾	322 (R+E)	11/8	76	95	68	97	100	69
Palacios y cols. ⁽¹⁵⁶⁾	235 (E)	18/0	90	98	86	99	-	90
Fadda y cols. ⁽¹⁵⁷⁾	622 (R+E)	124/71	97	100	100	99	100	79
Moore y Curry. ⁽¹⁵⁸⁾	493 (R)	34/13	77	99	91	98	100	56
Gamboa y cols. ⁽¹⁵⁹⁾	526 (E)	130/33	78	100	100	93	100	71
Garrino y cols. ⁽¹⁶⁰⁾	737 (R+E)	61/46	78	100	95	98	98	37
Lumb y cols. ⁽¹⁶¹⁾	2347 (R+E)	152/79	69	99	99	98	98	41
Viinanen y cols. ⁽¹⁶²⁾	247 (R)	31/24	83	97	84	98	96	43

(R) muestras respiratorias. (E) Muestras extrapulmonares. (S) Sensibilidad. (E) Especificidad. (VPP) Valor predictivo positivo. (VPN) Valor predictivo negativo.

El Sistema LCx no se encuentra actualmente comercializado.

Tabla 38: Estudios comparativos de las diferentes técnicas moleculares, en la detección de M. tuberculosis Complex.

Estudio (Referencia)	Método molecular	Número de muestras	Cultivos positivos/tinción positiva	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	Sensibilidad (%) para:	
								Muestras con Microscopía positiva	Muestras con Microscopía negativa
Wang y Tay. ⁽¹⁶³⁾	LCx ^a	230 (R)	72/66	100	99	99	100	100	100
	PCR	230 (R)	72/66	96	100	100	98	97	92
	AMTD	230 (R)	72/66	99	99	99	99	100	86
Brown y cols. ⁽¹⁶⁴⁾	LCx ^a	42 (R) 21 (E)	-	79 60	100	100	77 76	84 -	56 -
	PCR	42 (R) 21 (E)	-	75 50	100	100	77 74	84 -	33 -
Tortoli y cols. ⁽¹⁶⁵⁾	LCx ^a	697 (R+E)	110/84	86	99	-	-	93	70
	PCR	697 (R+E)	110/84	75	99	-	-	94	36
Scarparo y cols. ⁽¹⁶⁶⁾	AMTD2	296 (R) 190 (E)	114/97 33/25	86 83	100	100	90 95	92 88	65 75
	PCR	296 (R) 190 (E)	114/97 33/25	94 85	100	100	99 96	99 96	75 69
Della-Latta y Whittier. ⁽¹⁶⁷⁾	AMTD2	1385 (R)	62/-	97	99	-	-	100	93
	PCR	1380 (R)	62/-	97	100	-	-	97	96
Piersimoni y cols. ⁽¹⁶⁸⁾	AMTD2	331 (R) 184 (E)	91/76 30/22	88 74	99 100	-	-	93 95	62 47
	BD ProbeTec	331 (R) 184 (E)	91/76 30/22	94 92	99 100	-	-	98 100	75 82
Goessens y cols. ⁽¹⁶⁹⁾	PCR	824 (R)	109/67	78	98	-	-	95	50
	BD ProbeTec	824 (R)	109/67	86	98	-	-	100	64
Ichiyama y cols. ⁽¹⁷⁰⁾	PCR	530 (R)	129/-	89	100	-	-	-	-
	BD ProbeTec	530 (R)	129/-	95	98	-	-	-	-
Piersimoni y cols. ⁽¹²⁸⁾	AMTD2	327 (R)	60/33	96	99	94	99	100	87
	PCR	327 (R)	60/33	85	99	98	97	97	67

(a): Actualmente el Sistema de detección LCx se encuentra retirado del mercado.

6.1. Genotype Mycobacteria Direct en la detección de *M. tuberculosis* Complex y cuatro micobacterias atípicas. Diferentes aspectos.

A continuación se analizan los diferentes aspectos y características más importantes, que este estudio nos ha permitido conocer de GTMD, como nueva aportación al diagnóstico de la tuberculosis y las micobacteriosis.

6.1.1 GTMD en muestras respiratorias y extrapulmonares.

En nuestro estudio, la mayoría de las muestras clínicas, son muestras respiratorias, y más concretamente esputos, el 72% de las muestras. Además, la mayoría de ellas presentaron microscopía positiva, el 91% de ellas. Esto podría ser consecuencia, del importante sesgo que supone, la selección de las muestras que han sido utilizadas en el estudio, debido al imposible de realizar GTMD a cada una de las muestras que entran en el laboratorio para el estudio de micobacterias, entre otras cosas, porque nos encontraríamos con un gran número de muestras con resultados negativos.

A pesar de ello, y al igual que en muchos otros estudios GTMD ha mostrado un magnífico comportamiento en este tipo de muestra, alcanzando una sensibilidad de detección del 92%. Este porcentaje es muy similar al obtenido por su comparador, la PCR, cuya sensibilidad diagnóstica es igual o inferior a los resultados obtenidos mediante GTMD.^(133, 137, 139) Sin embargo otros estudios que han evaluado las técnicas AMTD2 y BD-ProbeTec, muestran resultados de sensibilidad ligeramente superiores, con valores entre el 95% y 97%.^(70, 143, 145)

En el análisis de las muestras extrapulmonares es donde encontramos la mayor diferencia de resultados, con su comparador, la PCR. La sensibilidad de GTMD en muestras extrapulmonares, un 61%, es casi el doble que la que obtiene la PCR, con un 33%. Este valor de sensibilidad de la PCR de Amplicor es muy similar al de otros estudios previamente publicados^(131, 142). También encontramos en la literatura,

trabajos en los que la sensibilidad es superior, empleando el sistema de amplificación de ARNr AMTD2.^(143, 144)

Una explicación a estos resultados tan dispares, puede ser que originariamente AMPLICOR-MTB, fue diseñado para su empleo en la detección de MTB en muestras de procedencia respiratoria. De manera que los reactivos que utiliza en la extracción, son reactivos diseñados de forma específica para muestras respiratorias⁽¹⁷¹⁾. Sin embargo, la extracción mecánica y la utilización de partículas magnéticas que emplea GTMD, mejora sensiblemente este proceso, fundamental en este tipo de técnicas moleculares.

6.1.2 GTMD en muestras con microscopía positiva y negativa.

Actualmente una de las principales utilidades en los laboratorios de microbiología, de las técnicas moleculares en el diagnóstico de la tuberculosis, es la información tan importante que aporta a aquellos casos clínicos en los cuales, la baciloscopia, ha resultado negativa y por su parte el clínico, mantiene una elevada sospecha de enfermedad y necesita tomar una decisión en cuanto a la instauración de un tratamiento antimicobacteriano empírico. En estos casos la rapidez y precisión de este tipo de técnicas puede ser de gran ayuda en el diagnóstico de la enfermedad.

Numerosos estudios son los que han evaluado a las principales técnicas moleculares en la detección de *M. tuberculosis Complex*, en muestras clínicas con microscopía negativa. La discrepancia de resultados entre ellos es considerable, debido fundamentalmente a que la visualización de las muestras mediante microscopía depende de numerosos factores ajenos a la muestra clínica, como se ha comentado anteriormente. Los porcentajes de sensibilidad encontrados oscilan desde el 17% en muestras extrapulmonares al 72% en muestras

respiratorias mediante Amplicor-MTB^(131, 137); desde el 64% al 87% en muestras extrapulmonares mediante AMTD2^(145, 146); y desde el 33% al 92% en muestras respiratorias mediante BD-ProbeTec^(70, 152).

En nuestro caso Genotype Mycobacteria Direct, obtuvo unos porcentajes de sensibilidad en muestras totales, con microscopía negativa del 48%, frente al 52% de su comparador Amplicor-MTB. Una posible explicación a estos resultados podría ser que en el 50% de las muestras con GTMD negativo, PCR negativa baciloscopia negativa y cultivo positivo, corresponden a muestras extrapulmonares con una baja carga micobacteriana, que podría justificarse por el empleo en nuestro laboratorio, de una técnica de microscopía de fluorescencia con una alta sensibilidad.^(87, 88)

6.1.3 GTMD en muestras de pacientes en tratamiento antituberculoso.

A lo largo del estudio, nos hemos encontrado en dos ocasiones, con la posibilidad de utilizar GTMD en aquellos casos en los que tras la instauración del tratamiento, las baciloscopias de paciente seguían siendo positivas o se reactivaban como positivas tras el paso del tiempo, después de negativizarse.

En esta situación es cuando los clínicos se plantean la posibilidad de una falta de adherencia al tratamiento antituberculoso por parte del paciente, o la presencia de una cepa de micobacterias resistente a los fármacos o incluso una reinfección, o recidiva de la enfermedad.

En nuestra experiencia GTMD nos ha servido para diferenciar estos posibles casos de recidiva o falta de respuesta del tratamiento, de simples escapes bacilares, que se producen en el paciente, evitando de este modo, posibles cambios de las pautas de tratamiento.

6.1.4 Incorporación de GTMD al flujo de trabajo en los laboratorios de microbiología.

La incorporación de GTMD a nuestro laboratorio ha supuesto una herramienta más al servicio del diagnóstico de la tuberculosis y micobacteriosis. Sin embargo, GTMD aporta la ventaja de poder detectar cuatro micobacterias atípicas, dentro de las cuales, se encuentran las tres especies de micobacterias atípicas más frecuentemente aisladas en nuestro laboratorio, *M. avium*, *M. kansasii* y *M. Intracellulare*.

Además después de este estudio queda demostrada su utilidad en aquellas muestras de origen extrapulmonar, y su extraordinaria rentabilidad en el proceso de extracción mediante partículas magnéticas. Las nuevas versiones de GTMD, se caracterizan por optimizar aún más este proceso de extracción, empleando un proceso de extracción química y partículas magnéticas.

Actualmente Genotype Mycobacteria Direct, está siendo utilizado en nuestro laboratorio, y está participando en la práctica habitual del mismo. Aunque, debido a la imposibilidad de poder realizar técnicas de microbiología molecular a todas las muestras recibidas, en el laboratorio de micobacteria, ambas técnicas moleculares presentes en laboratorio, GTMD y AMPLICOR-MTB se reservan para peticiones específicas de los clínicos y para aquellas muestras procedentes de pacientes con una alta sospecha de enfermedad.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones del estudio: "Evaluación de Genotype Mycobacteria Direct, nueva técnica genética de microbiología molecular en la detección de *M. tuberculosis Complex* y otras micobacterias atípicas en muestras de interés clínico" son:

1. Genotype Mycobacteria Direct ha permitido la detección de *M. tuberculosis Complex*, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. malmoense* directamente de muestras clínicas.
2. Los parámetros de validez de Genotype Mycobacteria Direct, teniendo como referencia los criterios de enfermedad clínicas han sido: sensibilidad 88%, especificidad 100%, valor predictivo positivo 100% y valor predictivo negativo 63%.
3. Genotype Mycobacteria Direct, permite la realización de la técnica en 4-5h.
4. Genotype Mycobacteria Direct, ha demostrado un gran rendimiento en las muestras de origen extrapulmonar, en comparación con Cobas Amplicor MTB, con una sensibilidad diagnóstica del 61%.
5. Genotype Mycobacteria Direct ha obtenido el mayor grado de concordancia clínica con la baciloscopia con un valor del *Índice Kappa* de 0,72.
6. Genotype Mycobacteria Direct podría permitir la detección de infecciones mixtas producidas por *M. tuberculosis Complex*, junto con *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. malmoense*.
7. El límite de detección de Genotype Mycobacteria Direct, realizado sobre un modelo de diluciones, ha sido de 5,9 UFC/mL.
8. Genotype Mycobacteria Direct ha permitido descartar la falta de adherencia al tratamiento antituberculoso y la reactivación de la enfermedad tuberculosa, detectado la presencia de poblaciones micobacterianas no viables en las muestras clínicas.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., et al.** *A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex.* Proc Natl Acad Sci U S A. **2002**; 99: 3684-9.
2. **García-Rodríguez, J.A., y Picazo, J.J.** *Microbiología Médica General.*, vol. 1.
3. **Mandell, Douglas, y Bennett.** *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica.*, 4 ed, vol. 1.
4. **Beggs, M.L., Stevanova, R., y Eisenach, K.D.** *Species identification of Mycobacterium avium complex isolates by a variety of molecular techniques.* J Clin Microbiol. **2000**; 38: 508-12.
5. **Swanson, D.S., Kapur, V., Stockbauer, K., Pan, X., Frothingham, R., y Musser, J.M.** *Subspecific differentiation of Mycobacterium avium complex strains by automated sequencing of a region of the gene (hsp65) encoding a 65-kilodalton heat shock protein.* Int J Syst Bacteriol. **1997**; 47: 414-9.
6. **Tortoli, E., Rindi, L., Garcia, M.J., Chiaradonna, P., Dei, R., Garzelli, C., et al.** *Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the Mycobacterium avium complex, to species rank as Mycobacterium chimaera sp. nov.* Int J Syst Evol Microbiol. **2004**; 54: 1277-85.
7. **Havlir, D.** *Mycobacterium avium complex: advances in therapy.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis **1994**; 13: 915-24.
8. **Nightingale, S., Byrd, L., Southem, P., Jockush, J., Cal, S., y Wynne, B.** *Incidence of Mycobacterium avium-intracellulare complex bacteriemia in human immunodeficiency virus-positive patients.* J Infect Dis **1992**; 165: 1082-85.
9. **Repáraz, J.** *Enfermedad por Mycobacterium kansasii.* Enferm Infecc Microbiol Clin. **1999**; 17: 85-90.
10. **Echevarría, M., Martín, G., Pérez, J., y Urkijo, J.** *Enfermedad pulmonar por Mycobacterium kansasii. Presentación de 27 casos.* Enferm Infecc Microbiol Clin. **1994**; 12: 280-84.
11. **Alcaide, F., Richter, I., y Bernasconi, C.** *Heterogeneity and clonality among isolates of Mycobacterium kansasii: implications for epidemiological and pathogenicity studies.* J Clin Microbiol **1997**; 35: 1959-64.
12. **Brown-Elliott, B.A., y Wallace, R.J., Jr.** *Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria.* Clin Microbiol Rev. **2002**; 15: 716-46.

13. **Jenkins, P.A.** *Mycobacterium malmoense*. Tubercle. **1985**; 66: 193-5.
14. **Warren, N.G., Body, B.A., Silcox, V.A., y Matthews, J.H.** *Pulmonary disease due to Mycobacterium malmoense*. J Clin Microbiol. **1984**; 20: 245-7.
15. **Zaugg, M., Salfinger, M., Opravil, M., y Luthy, R.** *Extrapulmonary and disseminated infections due to Mycobacterium malmoense: case report and review*. Clin Infect Dis. **1993**; 16: 540-9.
16. **Gutierrez, M.C., Brisse, S., Brosch, R., Fabre, M., Omais, B., Marmiesse, M., et al.** *Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. **2005**; 1: e5.
17. **Formicola, V., Milanesi, Q., y Scarsini, C.** *Evidence of spinal tuberculosis at the beginning of the fourth millenium BC from Arene Candide cave (Liguria, Italy)*. Am J Phys Anthropol. **1987**; 72: 1-6.
18. **Zink, A., Haas, C.J., Reischl, U., Szeimies, U., y Nerlich, A.G.** *Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population*. J Med Microbiol. **2001**; 50: 355-66.
19. **Zink, A.R., Sola, C., Reischl, U., Grabner, W., Rastogi, N., Wolf, H., et al.** *Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping*. J Clin Microbiol. **2003**; 41: 359-67.
20. **Sauret-Valet, J.** **1990.** *La tuberculosis a través de la Historia*, Rayma, Madrid. ed.
21. **Donoghue, H.D., Spigelman, M., Greenblatt, C.L., Lev-Maor, G., Bar-Gal, G.K., Matheson, C., et al.** *Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA*. Lancet Infect Dis. **2004**; 4: 584-92.
22. **Raviglione, M.C., Snider, D.E., Jr., y Kochi, A.** *Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic*. Jama. **1995**; 273: 220-6.
23. **Raviglione, M.C., y Luelmo, F.** *Update on the global epidemiology of tuberculosis*. Curr Issues Public Health. **1996**; 2: 192-7.
24. **Casal, M.** *La tuberculosis en el siglo XXI*. Enferm Infecc Microbiol Clin. **2000**; 18: 207-8.
25. **Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., y Raviglione, M.C.** *Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project*. Jama. **1999**; 282: 677-86.
26. **DeAngelis, C., y Flanagan, A.** *Tuberculosis: A Call for Papers*. Jama. **2004**; 292: 1889.

27. **Dye, C.** *The science of social diseases.* Science. **2005**; 307: 181.
28. **Cegielski, J.P., Chin, D.P., Espinal, M.A., Frieden, T.R., Rodriguez Cruz, R., Talbot, E.A., et al.** *The global tuberculosis situation. Progress and problems in the 20th century, prospects for the 21st century.* Infect Dis Clin North Am. **2002**; 16: 1-58.
29. **Floyd, K., Blanc, L., Raviglione, M., y Lee, J.W.** *Resources required for global tuberculosis control.* Science. **2002**; 295: 2040-1.
30. **Frieden, T.R., Sterling, T.R., Munsiff, S.S., Watt, C.J., y Dye, C.** *Tuberculosis.* Lancet. **2003**; 362: 887-99.
31. **Raviglione, M.C.** *The TB epidemic from 1992 to 2002.* Tuberculosis (Edinb). **2003**; 83: 4-14.
32. **Gupta, R., Espinal, M.A., y Raviglione, M.C.** *Tuberculosis as a major global health problem in the 21st century: a WHO perspective.* Semin Respir Crit Care Med. **2004**; 25: 245-53.
33. **Maher, D., y Raviglione, M.** *Global epidemiology of tuberculosis.* Clin Chest Med. **2005**; 26: 167-82, v.
34. **Nunn, P., Williams, B., Floyd, K., Dye, C., Elzinga, G., y Raviglione, M.** *Tuberculosis control in the era of HIV.* Nat Rev Immunol. **2005**; 5: 819-26.
35. **Dye, C.** *Tuberculosis 2000-2010: control, but not elimination.* Int J Tuberc Lung Dis. **2000**; 4: S146-52.
36. **Dye, C., Watt, C.J., Bleed, D.M., Hosseini, S.M., y Raviglione, M.C.** *Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally.* Jama. **2005**; 293: 2767-75.
37. **Veen, J., Perrocheau, A., y Schwoebel, V.** *Surveillance of tuberculosis in the WHO European region in 1995 : results of the feasibility study.* Euro Surveill. **1998**; 3: 2-5.
38. **Broekmans, J.F., Migliori, G.B., Rieder, H.L., Lees, J., Ruutu, P., Loddenkemper, R., et al.** *European framework for tuberculosis control and elimination in countries with a low incidence. Recommendations of the World Health Organization (WHO), International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) and Royal Netherlands Tuberculosis Association (KNCV) Working Group.* Eur Respir J. **2002**; 19: 765-75.
39. **Rieder, H.L., Watson, J.M., Raviglione, M.C., Forssbohm, M., Migliori, G.B., Schwoebel, V., et al.** *Surveillance of tuberculosis in Europe. Working Group of the World Health Organization (WHO) and the European Region of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) for uniform reporting on tuberculosis cases.* Eur Respir J. **1996**; 9: 1097-104.

40. **Cayla, J.A., Galdos-Tanguis, H., Jansa, J.M., Garcia de Olalla, P., Brugal, T., y Panella, H.** *Evolucion de la tuberculosis en Barcelona (1987-1995). Influencia del virus de la inmunodeficiencia humana y de las medidas de control.* Med Clin (Barc). **1998**; 111: 608-15.
41. **Rodrigo, T., Cayla, J.A., Galdos-Tanguis, H., Jansa, J.M., Brugal, T., y Garcia de Olalla, P.** *Evaluacion de los programas de control de tuberculosis de las Comunidades Autonomas de Espana.* Med Clin (Barc). **1999**; 113: 604-7.
42. **Valles, X., Sanchez, F., Panella, H., Garcia De Olalla, P., Jansa, J.M., y Cayla, J.A.** *Tuberculosis importada: una enfermedad emergente en paises industrializados.* Med Clin (Barc). **2002**; 118: 376-8.
43. **Anónimo.** *Documento de consenso sobre la prevencion y control de la tuberculosis en Espana. Unidad de Investigacion en Tuberculosis de Barcelona (UITB). Area de Tuberculosis e Infecciones Respiratorias (TIR) de la Sociedad Espanola de Neumologia y Cirugia Toracica (SEPAR) y Grupo de Estudio de Sida (GESIDA) de la Sociedad Espanola de Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica (SEIMC).* Med Clin (Barc). **1999**; 113: 710-5.
44. **Arce Arnaez, A., Inigo Martinez, J., Cabello Ballesteros, L., y Burgoa Arenales, M.** *Tuberculosis e inmigracion en un area sanitaria de Madrid. Situacion epidemiologica y evolucion en la decada 1994-2003.* Med Clin (Barc). **2005**; 125: 210-2.
45. **Cacho Calvo, J., Astray Mochales, J., Perez Meixeira, A., Ramos Martos, A., Hernando Garcia, M., Sanchez Concheiro, M., et al.** *Ten-year population-based molecular epidemiological study of tuberculosis transmission in the metropolitan area of Madrid, Spain.* Int J Tuberc Lung Dis. **2005**; 9: 1236-41.
46. **Huerga, H., Lopez-Velez, R., Navas, E., y Gomez-Mampaso, E.** *Clinicoepidemiological features of immigrants with tuberculosis living in Madrid, Spain.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **2000**; 19: 236-7.
47. **Chin, D.P., Crane, C.M., Diul, M.Y., Sun, S.J., Agraz, R., Taylor, S., et al.** *Spread of Mycobacterium tuberculosis in a community implementing recommended elements of tuberculosis control.* Jama. **2000**; 283: 2968-74.
48. **Anónimo.** *Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999.* Am J Respir Crit Care Med. **2000**; 161: 1376-95.
49. **Anónimo.** *American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: controlling tuberculosis in the United States.* Am J Respir Crit Care Med. **2005**; 172: 1169-227.

50. **Anónimo.** *Guidelines for preventing the transmission of Mycobacterium tuberculosis in health-care facilities, 1994.* Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep. **1994**; 43: 1-132.
51. **Tenover, F.C., Crawford, J.T., Huebner, R.E., Geiter, L.J., Horsburgh, C.R., Jr., y Good, R.C.** *The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready?* J Clin Microbiol. **1993**; 31: 767-70.
52. **Catanzaro, A.** *What is the appropriate use of the rapid diagnostic tests for tuberculosis?* Monaldi Arch Chest Dis. **1997**; 52: 27-32.
53. **Clarridge, J.E., 3rd, Shawar, R.M., Shinnick, T.M., y Plikaytis, B.B.** *Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in a routine mycobacteriology laboratory.* J Clin Microbiol. **1993**; 31: 2049-56.
54. **Stockman, L., Springer, B., Bottger, E.C., y Roberts, G.D.** *Mycobacterium tuberculosis nucleic acid probes for rapid diagnosis.* Lancet. **1993**; 341: 1486.
55. **Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E.C., y Bodmer, T.** *Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis.* J Clin Microbiol. **1993**; 31: 175-8.
56. **Cheng, V.C., Yew, W.W., y Yuen, K.Y.** *Molecular diagnostics in tuberculosis.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **2005**; 24: 711-20.
57. **Salfinger, M., y Pfyffer, G.E.** *The new diagnostic mycobacteriology laboratory.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **1994**; 13: 961-79.
58. **Woods, G.L.** *Molecular methods in the detection and identification of mycobacterial infections.* Arch Pathol Lab Med. **1999**; 123: 1002-6.
59. **Soini, H., y Musser, J.M.** *Molecular diagnosis of mycobacteria.* Clin Chem. **2001**; 47: 809-14.
60. **Anónimo.** *Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep. **2000**; 49: 593-4.
61. **Piersimoni, C., y Scarparo, C.** *Relevance of commercial amplification methods for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples.* J Clin Microbiol. **2003**; 41: 5355-65.
62. **Hermans, P.W., Schuitema, A.R., Van Soolingen, D., Verstynen, C.P., Bik, E.M., Thole, J.E., et al.** *Specific detection of Mycobacterium tuberculosis complex strains by polymerase chain reaction.* J Clin Microbiol. **1990**; 28: 1204-13.
63. **Sjobring, U., Mecklenburg, M., Andersen, A.B., y Miorner, H.** *Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis.* J Clin Microbiol. **1990**; 28: 2200-4.

64. **Bennedsen, J., Thomsen, V.O., Pfyffer, G.E., Funke, G., Feldmann, K., Beneke, A., et al.** *Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis.* J Clin Microbiol. **1996**; 34: 1407-11.
65. **Bodmer, T., Gurtner, A., Scholkmann, M., y Matter, L.** *Evaluation of the COBAS AMPLICOR MTB system.* J Clin Microbiol. **1997**; 35: 1604-5.
66. **Kwoh, D.Y., Davis, G.R., Whitfield, K.M., Chappelle, H.L., DiMichele, L.J., y Gingeras, T.R.** *Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format.* Proc Natl Acad Sci U S A. **1989**; 86: 1173-7.
67. **Welch, K., Brown, G., Jonas, V., y Ferraro, M.J.** *Performance of the Gen-Probe amplified Mycobacterium tuberculosis direct test in a laboratory that infrequently isolates Mycobacterium tuberculosis.* Diagn Microbiol Infect Dis. **1995**; 22: 297-9.
68. **Bergmann, J.S., Keating, W.E., y Woods, G.L.** *Clinical evaluation of the BDProbeTec ET system for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis.* J Clin Microbiol. **2000**; 38: 863-5.
69. **Bergmann, J.S., y Woods, G.L.** *Clinical evaluation of the BDProbeTec strand displacement amplification assay for rapid diagnosis of tuberculosis.* J Clin Microbiol. **1998**; 36: 2766-8.
70. **Pfyffer, G.E., Funke-Kissling, P., Rundler, E., y Weber, R.** *Performance characteristics of the BDProbeTec system for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens.* J Clin Microbiol. **1999**; 37: 137-40.
71. **Johansen, I.S., Lundgren, B., Sosnovskaja, A., y Thomsen, V.O.** *Direct detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens in low- and high-incidence countries by line probe assay.* J Clin Microbiol. **2003**; 41: 4454-6.
72. **Viveiros, M., Leandro, C., Rodrigues, L., Almeida, J., Bettencourt, R., Couto, I., et al.** *Direct application of the INNO-LiPA Rif.TB line-probe assay for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex strains and detection of rifampin resistance in 360 smear-positive respiratory specimens from an area of high incidence of multidrug-resistant tuberculosis.* J Clin Microbiol. **2005**; 43: 4880-4.
73. **Rossau, R., Traore, H., De Beenhouwer, H., Mijs, W., Jannes, G., De Rijk, P., et al.** *Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and its resistance to rifampin.* Antimicrob Agents Chemother. **1997**; 41: 2093-8.
74. **Alcaide, F., Esteban, J., González, J., y Palacios, J.J.** *Micobacterias.* Procedimientos en Microbiología Clínica.

75. **Broccolo, F., Scarpellini, P., Locatelli, G., Zingale, A., Brambilla, A.M., Cichero, P., et al.** *Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of Mycobacterium tuberculosis load by two real-time calibrated PCR assays.* J Clin Microbiol. **2003**; 41: 4565-72.
76. **Chakravorty, S., y Tyagi, J.S.** *Novel multipurpose methodology for detection of mycobacteria in pulmonary and extrapulmonary specimens by smear microscopy, culture, and PCR.* J Clin Microbiol. **2005**; 43: 2697-702.
77. **Tan, J., Lee, B.W., Lim, T.K., Chin, N.K., Tan, C.B., Xia, J.R., et al.** *Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum, pleural and bronchoalveolar lavage fluid using DNA amplification of the MPB 64 protein coding gene and IS6110 insertion element.* Southeast Asian J Trop Med Public Health. **1995**; 26: 247-52.
78. **Caws, M., Wilson, S.M., Clough, C., y Drobniewski, F.** *Role of IS6110-targeted PCR, culture, biochemical, clinical, and immunological criteria for diagnosis of tuberculous meningitis.* J Clin Microbiol. **2000**; 38: 3150-5.
79. **Yuen, K.Y., Yam, W.C., Wong, L.P., y Seto, W.H.** *Comparison of two automated DNA amplification systems with a manual one-tube nested PCR assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis.* J Clin Microbiol. **1997**; 35: 1385-9.
80. **Chan, A., y Fox, F.** *NASBA and other transcription-based amplification methods for research and diagnostic microbiology.* Rev Med Microbiol. **1999**; 10: 185-96.
81. **Deiman, B., van Aarle, P., y Sillekens, P.** *Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA).* Mol Biotechnol. **2002**; 20: 163-79.
82. **Kievits, T., van Gemen, B., van Strijp, D., Schukkink, R., Dircks, M., Adriaanse, H., et al.** *NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection.* J Virol Methods. **1991**; 35: 273-86.
83. **Franco-Alvarez de Luna, F., Ruiz, P., Gutierrez, J., y Casal, M.** *Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for detection of Mycobacterium tuberculosis complex and four atypical mycobacterial species in clinical samples.* J Clin Microbiol. **2006**; 44: 3025-7.
84. **Boden, D., Weizenegger, M., Benz, K., Ponstingl, W., Hengstler, M., Ruschgerdes, S., et al.** *Reverse hybridization assay for rapid identification of Mycobacteria from culture samples.* Clin Lab. **1998**; 44: 687-92.
85. **Miller, N., Infante, S., y Cleary, T.** *Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles.* J Clin Microbiol. **2000**; 38: 1915-9.

86. **Ruiz, P., Gutierrez, J., Zerolo, F.J., y Casal, M.** *GenoType mycobacterium assay for identification of mycobacterial species isolated from human clinical samples by using liquid medium.* J Clin Microbiol. **2002**; 40: 3076-8.
87. **Casal, M., y Clemente, M.J.** *Interés clínico de una nueva técnica de microscopía en el diagnóstico rápido de tuberculosis pulmonar.* An Med Intern. **1990**; 7: 390-91.
88. **Casal, M., y Clemente, M.J.** *Interés clínico de una nueva técnica de visualización microscópica en tuberculosis extrapulmonar.* Med Clin (Barc). **1991**; 96: 491-92.
89. **Buijtel, P.C., y Petit, P.L.** *Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens.* J Microbiol Methods. **2005**; 62: 83-8.
90. **Lorian, V., y Lacasse, M.L.** *N-acetyl-L-cysteine sputum homogenization and its mechanism of action on isolation of tubercle bacilli.* Dis Chest. **1967**; 51: 275-7.
91. **Ratnam, S., Stead, F.A., y Howes, M.** *Simplified acetylcysteine-alkali digestion-decontamination procedure for isolation of mycobacteria from clinical specimens.* J Clin Microbiol. **1987**; 25: 1428-32.
92. **Alcaide, F., Benitez, M.A., Escriba, J.M., y Martin, R.** *Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/BacT systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe.* J Clin Microbiol. **2000**; 38: 398-401.
93. **Badak, F.Z., Goksel, S., Sertoz, R., Nafie, B., Ermertcan, S., Cavusoglu, C., et al.** *Use of nucleic acid probes for identification of Mycobacterium tuberculosis directly from MB/BacT bottles.* J Clin Microbiol. **1999**; 37: 1602-5.
94. **Evans, K.D., Nakasone, A.S., Sutherland, P.A., de la Maza, L.M., y Peterson, E.M.** *Identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium-M. intracellulare directly from primary BACTEC cultures by using acridinium-ester-labeled DNA probes.* J Clin Microbiol. **1992**; 30: 2427-31.
95. **Goto, M., Oka, S., Okuzumi, K., Kimura, S., y Shimada, K.** *Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare complex in culture.* J Clin Microbiol. **1991**; 29: 2473-6.
96. **Makinen, J., Marjamaki, M., Marttila, H., y Soini, H.** *Evaluation of a novel strip test, GenoType Mycobacterium CM/AS, for species identification of mycobacterial cultures.* Clin Microbiol Infect. **2006**; 12: 481-3.

97. **Richter, E., Rusch-Gerdes, S., y Hillemann, D.** *Evaluation of the GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species from cultures.* J Clin Microbiol. **2006**; 44: 1769-75.
98. **Russo, C., Tortoli, E., y Menichella, D.** *Evaluation of the new GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species.* J Clin Microbiol. **2006**; 44: 334-9.
99. **Desjardin, L.E., Perkins, M.D., Wolski, K., Haun, S., Teixeira, L., Chen, Y., et al.** *Measurement of sputum Mycobacterium tuberculosis messenger RNA as a surrogate for response to chemotherapy.* Am J Respir Crit Care Med. **1999**; 160: 203-10.
100. **Moore, D.F., Curry, J.I., Knott, C.A., y Jonas, V.** *Amplification of rRNA for assessment of treatment response of pulmonary tuberculosis patients during antimicrobial therapy.* J Clin Microbiol. **1996**; 34: 1745-9.
101. **Bollela, V.R., Sato, D.N., y Fonseca, B.A.** *McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using Mycobacterium tuberculosis as a research tool.* Braz J Med Biol Res. **1999**; 32: 1073-6.
102. **OMS.** *Informe Anual Mundial de la OMS sobre la tuberculosis.* www.who.int/es/ (WHO/CDS/TB/2006.104).
103. **Dolin, P.J., Raviglione, M.C., y Kochi, A.** *Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000.* Bull World Health Organ. **1994**; 72: 213-20.
104. **Alcaide Megias, J., Altet Gomez, M.N., y Canela i Soler, J.** *Epidemiologia de la tuberculosis.* An Esp Pediatr. **2000**; 53: 449-57.
105. **OMS.** *The Stop TB Strategy.* <http://www.who.int/es/>. **2006**: 368.
106. **OMS.** *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing.* 2005. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2005/en/.
107. **Casal, M., Guerrero, A., Martín, N., Moreno, S., y Nogales, M.C.** *En Diagnóstico Microbiológico de las infecciones por micobacterias. Procedimientos en Microbiología Clínica,* 2005 ed. Picazo, J.J.
108. **Metchock, B.G., Nolte, F.S., y Wallace, R.J.** *Mycobacterium En Manual of Clinical Microbiology.*, 1999, 7ª ed. Murray, P.R., ASM Press, Washington, D.C.
109. **Tiwari, R.P., Hattikudur, N.S., Bharmal, R.N., Kartikeyan, S., Deshmukh, N.M., y Bisen, P.S.** *Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: Promises and challenges ahead.* Tuberculosis (Edinb). **2006**:
110. **Watterson, S.A., y Drobniowski, F.A.** *Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections.* J Clin Pathol. **2000**; 53: 727-32.

111. **Aguado, J.M., Rufi, G., García-Rodríguez, J.A., Solera, J., y Moreno, S.** *Tuberculosis*. Protocolos Clínicos SEIMC.
112. **Bass, J.B., Jr., Farer, L.S., Hopewell, P.C., O'Brien, R., Jacobs, R.F., Ruben, F., et al.** *Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. American Thoracic Society and The Centers for Disease Control and Prevention*. *Am J Respir Crit Care Med*. **1994**; 149: 1359-74.
113. **Blumberg, H.M., Burman, W.J., Chaisson, R.E., Daley, C.L., Etkind, S.C., Friedman, L.N., et al.** *American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med*. **2003**; 167: 603-62.
114. **du Toit, L.C., Pillay, V., y Danckwerts, M.P.** *Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches*. *Respir Res*. **2006**; 7: 118.
115. **OMS.** *Treatment of tuberculosis-guidelines for national programmes, 3rd ed.* Geneva. <http://www.who.int/es/> (WHO/CDS/TB/2003.313).
116. **Anónimo.** *The results of DOTS strategy*. *Kekkaku*. **2004**; 79: 59-61.
117. **Macq, J.C., Theobald, S., Dick, J., y Dembele, M.** *An exploration of the concept of directly observed treatment (DOT) for tuberculosis patients: from a uniform to a customised approach*. *Int J Tuberc Lung Dis*. **2003**; 7: 103-9.
118. **Pope, D.S., y Chaisson, R.E.** *TB treatment: as simple as DOT?* *Int J Tuberc Lung Dis*. **2003**; 7: 611-5.
119. **Soares, E.C., Pacheco, A.G., Mello, F.C., Durovni, B., Chaisson, R.E., y Cavalcante, S.C.** *Improvements in treatment success rates with directly observed therapy in Rio de Janeiro City*. *Int J Tuberc Lung Dis*. **2006**; 10: 690-5.
120. **OMS.** *Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis*. Geneva. . <http://www.who.int/es/> (WHO/CDS/TB/2006.361).
121. **Drobniewski, F.A., Caws, M., Gibson, A., y Young, D.** *Modern laboratory diagnosis of tuberculosis*. *Lancet Infect Dis*. **2003**; 3: 141-7.
122. **Heifets, L.** *Dilemmas and realities of rapid diagnostic tests for tuberculosis*. *Chest*. **2000**; 118: 4-5.
123. **Ieven, M., y Goossens, H.** *Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory*. *Clin Microbiol Rev*. **1997**; 10: 242-56.
124. **Mullis, K.B., y Faloona, F.A.** *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. *Methods in Enzymology*. **1987**; 155: 335-50.

125. **Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H.A. 1986.** *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.*
126. **Michos, A.G., Daikos, G.L., Tzanetou, K., Theodoridou, M., Moschovi, M., Nicolaidou, P., et al. 2006.** *Detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in respiratory and nonrespiratory specimens by the AmpliCor MTB PCR.* *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2006**; 54: 121-6.
127. **Middleton, A.M., Cullinan, P., Wilson, R., Kerr, J.R., y Chadwick, M.V. 2003.** *Interpreting the results of the amplified Mycobacterium tuberculosis direct test for detection of M. tuberculosis rRNA.* *J Clin Microbiol.* **2003**; 41: 2741-3.
128. **Piersimoni, C., Callegaro, A., Nista, D., Bornigia, S., De Conti, F., Santini, G., et al. 1997.** *Comparative evaluation of two commercial amplification assays for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens.* *J Clin Microbiol.* **1997**; 35: 193-6.
129. **McHugh, T.D., Pope, C.F., Ling, C.L., Patel, S., Billington, O.J., Gosling, R.D., et al. 2004.** *Prospective evaluation of BDProbeTec strand displacement amplification (SDA) system for diagnosis of tuberculosis in non-respiratory and respiratory samples.* *J Med Microbiol.* **2004**; 53: 1215-9.
130. **Lemus, D., Martin, A., Montoro, E., Portaels, F., y Palomino, J.C. 2004.** *Rapid alternative methods for detection of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis.* *J Antimicrob Chemother.* **2004**; 54: 130-3.
131. **Mitarai, S., Shishido, H., Kurashima, A., Tamura, A., y Nagai, H. 2000.** *Comparative study of ampliCor Mycobacterium PCR and conventional methods for the diagnosis of pleuritis caused by mycobacterial infection.* *Int J Tuberc Lung Dis.* **2000**; 4: 871-6.
132. **Gomez-Pastrana, D., Torronteras, R., Caro, P., Anguita, M.L., Lopez-Barrío, A.M., Andres, A., et al. 2001.** *Comparison of ampliCor, in-house polymerase chain reaction, and conventional culture for the diagnosis of tuberculosis in children.* *Clin Infect Dis.* **2001**; 32: 17-22.
133. **Rajalahti, I., Vuorinen, P., Nieminen, M.M., y Miettinen, A. 1998.** *Detection of Mycobacterium tuberculosis complex in sputum specimens by the automated Roche Cobas AmpliCor Mycobacterium Tuberculosis Test.* *J Clin Microbiol.* **1998**; 36: 975-8.
134. **Eing, B.R., Becker, A., Sohns, A., y Ringelmann, R. 1998.** *Comparison of Roche Cobas AmpliCor Mycobacterium tuberculosis assay with in-house PCR and culture for detection of M. tuberculosis.* *J Clin Microbiol.* **1998**; 36: 2023-9.
135. **Reischl, U., Lehn, N., Wolf, H., y Naumann, L. 1998.** *Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens.* *J Clin Microbiol.* **1998**; 36: 2853-60.

136. **Rimek, D., Tyagi, S., y Kappe, R.** *Performance of an IS6110-based PCR assay and the COBAS AMPLICOR MTB PCR system for detection of Mycobacterium tuberculosis complex DNA in human lymph node samples.* J Clin Microbiol. **2002**; 40: 3089-92.
137. **Bogard, M., Vincelette, J., Antinozzi, R., Alonso, R., Fenner, T., Schirm, J., et al.** *Multicenter study of a commercial, automated polymerase chain reaction system for the rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens in routine clinical practice.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **2001**; 20: 724-31.
138. **Shah, S., Miller, A., Mastellone, A., Kim, K., Colaninno, P., Hochstein, L., et al.** *Rapid diagnosis of tuberculosis in various biopsy and body fluid specimens by the AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis polymerase chain reaction test.* Chest. **1998**; 113: 1190-4.
139. **Gamboa, F., Manterola, J.M., Lonca, J., Matas, L., Cardona, P.J., Padilla, E., et al.** *Comparative evaluation of two commercial assays for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **1998**; 17: 151-7.
140. **Cohen, R.A., Muzaffar, S., Schwartz, D., Bashir, S., Luke, S., McGartland, L.P., et al.** *Diagnosis of pulmonary tuberculosis using PCR assays on sputum collected within 24 hours of hospital admission.* Am J Respir Crit Care Med. **1998**; 157: 156-61.
141. **Al Zahrani, K., Al Jahdali, H., Poirier, L., Rene, P., Gennaro, M.L., y Menzies, D.** *Accuracy and utility of commercially available amplification and serologic tests for the diagnosis of minimal pulmonary tuberculosis.* Am J Respir Crit Care Med. **2000**; 162: 1323-9.
142. **Bonington, A., Strang, J.I., Klapper, P.E., Hood, S.V., Rubombora, W., Penny, M., et al.** *Use of Roche AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis PCR in early diagnosis of tuberculous meningitis.* J Clin Microbiol. **1998**; 36: 1251-4.
143. **Gamboa, F., Fernandez, G., Padilla, E., Manterola, J.M., Lonca, J., Cardona, P.J., et al.** *Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and nonrespiratory specimens.* J Clin Microbiol. **1998**; 36: 684-9.
144. **Woods, G.L., Bergmann, J.S., y Williams-Bouyer, N.** *Clinical Evaluation of the Gen-Probe amplified mycobacterium tuberculosis direct test for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in select nonrespiratory specimens.* J Clin Microbiol. **2001**; 39: 747-9.
145. **O'Sullivan, C.E., Miller, D.R., Schneider, P.S., y Roberts, G.D.** *Evaluation of Gen-Probe amplified mycobacterium tuberculosis direct test by using*

- respiratory and nonrespiratory specimens in a tertiary care center laboratory.* J Clin Microbiol. **2002**; 40: 1723-7.
146. **Alcala, L., Ruiz-Serrano, M.J., Hernangomez, S., Marin, M., Garcia de Viedma, D., San Juan, R., et al.** *Evaluation of the upgraded amplified Mycobacterium tuberculosis direct test (gen-probe) for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and non-respiratory specimens.* Diagn Microbiol Infect Dis. **2001**; 41: 51-6.
147. **Chedore, P., y Jamieson, F.B.** *Routine use of the Gen-Probe MTD2 amplification test for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens in a large public health mycobacteriology laboratory.* Diagn Microbiol Infect Dis. **1999**; 35: 185-91.
148. **Chedore, P., y Jamieson, F.B.** *Rapid molecular diagnosis of tuberculous meningitis using the Gen-probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis direct test in a large Canadian public health laboratory.* Int J Tuberc Lung Dis. **2002**; 6: 913-9.
149. **Catanzaro, A., Perry, S., Clarridge, J.E., Dunbar, S., Goodnight-White, S., LoBue, P.A., et al.** *The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis: results of a multicenter prospective trial.* Jama. **2000**; 283: 639-45.
150. **Bergmann, J.S., Yuoh, G., Fish, G., y Woods, G.L.** *Clinical evaluation of the enhanced Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for rapid diagnosis of tuberculosis in prison inmates.* J Clin Microbiol. **1999**; 37: 1419-25.
151. **Johansen, I.S., Thomsen, V.O., Johansen, A., Andersen, P., y Lundgren, B.** *Evaluation of a new commercial assay for diagnosis of pulmonary and nonpulmonary tuberculosis.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **2002**; 21: 455-60.
152. **Barrett, A., Magee, J.G., y Freeman, R.** *An evaluation of the BD ProbeTec ET system for the direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory samples.* J Med Microbiol. **2002**; 51: 895-8.
153. **Maugein, J., Fourche, J., Vacher, S., Grimond, C., y Bebear, C.** *Evaluation of the BDProbeTec ET DTB assay(1) for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex from clinical samples.* Diagn Microbiol Infect Dis. **2002**; 44: 151-5.
154. **Mazzarelli, G., Rindi, L., Piccoli, P., Scarparo, C., Garzelli, C., y Tortoli, E.** *Evaluation of the BDProbeTec ET system for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary and extrapulmonary samples: a multicenter study.* J Clin Microbiol. **2003**; 41: 1779-82.
155. **Alonso, P., Orduna, A., Bratos, M.A., San Miguel, A., y Rodriguez Torres, A.** *Clinical evaluation of a commercial ligase-based gene amplification method*

- for detection of Mycobacterium tuberculosis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **1998**; 17: 371-6.
156. **Palacios, J.J., Ferro, J., Ruiz Palma, N., Roces, S.G., Villar, H., Rodriguez, J., et al.** *Comparison of the ligase chain reaction with solid and liquid culture media for routine detection of Mycobacterium tuberculosis in nonrespiratory specimens*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **1998**; 17: 767-72.
157. **Fadda, G., Ardito, F., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Ortona, L., Chezzi, C., et al.** *Evaluation of the Abbott LCx Mycobacterium tuberculosis assay in comparison with culture methods in selected Italian patients*. New Microbiol. **1998**; 21: 97-103.
158. **Moore, D.F., y Curry, J.I.** *Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis directly from sputum sediments by ligase chain reaction*. J Clin Microbiol. **1998**; 36: 1028-31.
159. **Gamboa, F., Dominguez, J., Padilla, E., Manterola, J.M., Gazapo, E., Lonca, J., et al.** *Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by ligase chain reaction amplification*. J Clin Microbiol. **1998**; 36: 1324-9.
160. **Garrino, M.G., Glupczynski, Y., Degraux, J., Nizet, H., y Delmee, M.** *Evaluation of the Abbott LCx Mycobacterium tuberculosis assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in human samples*. J Clin Microbiol. **1999**; 37: 229-32.
161. **Lumb, R., Davies, K., Dawson, D., Gibb, R., Gottlieb, T., Kershaw, C., et al.** *Multicenter evaluation of the Abbott LCx Mycobacterium tuberculosis ligase chain reaction assay*. J Clin Microbiol. **1999**; 37: 3102-7.
162. **Viinanen, A.H., Soini, H., Marjamaki, M., Liippo, K., y Viljanen, M.K.** *Ligase chain reaction assay is clinically useful in the discrimination of smear-positive pulmonary tuberculosis from atypical mycobacterioses*. Ann Med. **2000**; 32: 279-83.
163. **Wang, S.X., y Tay, L.** *Evaluation of three nucleic acid amplification methods for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens*. J Clin Microbiol. **1999**; 37: 1932-4.
164. **Brown, T.J., Power, E.G., y French, G.L.** *Evaluation of three commercial detection systems for Mycobacterium tuberculosis where clinical diagnosis is difficult*. J Clin Pathol. **1999**; 52: 193-7.
165. **Tortoli, E., Tronci, M., Tosi, C.P., Galli, C., Lavinia, F., Natili, S., et al.** *Multicenter evaluation of two commercial amplification kits (Amplacor, Roche and LCx, Abbott) for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary and extrapulmonary specimens*. Diagn Microbiol Infect Dis. **1999**; 33: 173-9.

166. **Scarparo, C., Piccoli, P., Rigon, A., Ruggiero, G., Scagnelli, M., y Piersimoni, C.** *Comparison of enhanced Mycobacterium tuberculosis amplified direct test with COBAS AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory and extrapulmonary specimens.* J Clin Microbiol. **2000**; 38: 1559-62.
167. **Della-Latta, P., y Whittier, S.** *Comprehensive evaluation of performance, laboratory application, and clinical usefulness of two direct amplification technologies for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex.* Am J Clin Pathol. **1998**; 110: 301-10.
168. **Piersimoni, C., Scarparo, C., Piccoli, P., Rigon, A., Ruggiero, G., Nista, D., et al.** *Performance assessment of two commercial amplification assays for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex from respiratory and extrapulmonary specimens.* J Clin Microbiol. **2002**; 40: 4138-42.
169. **Goessens, W.H., de Man, P., Koeleman, J.G., Luijendijk, A., te Witt, R., Endtz, H.P., et al.** *Comparison of the COBAS AMPLICOR MTB and BDProbeTec ET assays for detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens.* J Clin Microbiol. **2005**; 43: 2563-6.
170. **Ichiyama, S., Ito, Y., Sugiura, F., Iinuma, Y., Yamori, S., Shimojima, M., et al.** *Diagnostic value of the strand displacement amplification method compared to those of Roche Amplicor PCR and culture for detecting mycobacteria in sputum samples.* J Clin Microbiol. **1997**; 35: 3082-5.
171. **Honore-Bouakline, S., Vincensini, J.P., Giacuzzo, V., Lagrange, P.H., y Herrmann, J.L.** *Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction.* J Clin Microbiol. **2003**; 41: 2323-9.

A la memoria de *Francisco Álvarez de Luna Chaparro*.