

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS POR EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Oriana Rivera Lozada *

RESUMEN

La tuberculosis es la primera causa de muerte por enfermedad infecciosa en el mundo, y continua siendo considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un problema mayor en la salud pública. Uno de los principales inconvenientes, es el diagnóstico, el cual presenta muchas limitaciones; como respuesta, la investigación busca mejorar la calidad de las pruebas convencionales y la implementación de técnicas moleculares con el fin de lograr métodos rápidos y confiables que acorten el tiempo de diagnóstico y sean asequibles a toda la población. El objetivo de esta revisión es describir algunos métodos de diagnóstico para la tuberculosis por el laboratorio de Microbiología, desde las técnicas tradicionales a las nuevas metodologías, presentando sus ventajas, desventajas y su posibilidad de ser aplicada a las poblaciones afectadas como parte de la estrategia para la lucha contra la tuberculosis.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis, diagnóstico, métodos.*

ABSTRACT

Tuberculosis is the first cause for death by infectious disease in the world. And today, it continues to be considered a major problem in public health based on the World Health Organization (WHO). One of the first problems is the diagnosis, which encounters many limitations. As a result, research on this area seeks to develop new techniques and to better the quality of the existing ones as well as to implement new molecular tests with the goal of achieving accurate a feasible methods that would guarantee it reaches the general population. The objective of this revision is to describe some methods of diagnosis of Tuberculosis performed by the Laboratory of Microbiology in an attempt to show and to compare the traditional

Recibido para evaluación: enero 22 de 2008. Aprobado para publicación: febrero 26 de 2008

* Docente Departamento de Patología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia.
Grupo de Investigación en Inmunología y Enfermedades Infecciosas, Universidad del Cauca.

Correspondencia: Oriana Rivera. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca, , Carrera 6 No. 13 N 50 Popayán Colombia.
Email: orivera@unicauca.edu.co

methodologies to the newest ones by showing its advantages and disadvantages and the possibilities to apply them to the affected population as part of the general strategy to combat this disease.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis, methods, diagnosis,*

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es considerada a nivel mundial como una enfermedad reemergente que sigue siendo un grave problema de salud pública en muchos países, entre ellos Colombia; según la Organización Mundial de la Salud (OMS) gran parte de la población mundial ha tenido contacto con el bacilo tuberculoso y podría presentar la enfermedad en los próximos años (1- 3).

A pesar de haberse descubierto la etiología desde hace más de 100 años, el problema continua creciendo y en 1993 fue declarada una emergencia mundial (4,5). Según datos de la OMS publicados en el séptimo informe global sobre tuberculosis (TB)(6), la enfermedad se incrementa en un 0.4% cada año. Del año 2001 se informaron 3.8013.109 casos de los 8 millones/año estimados, para una incidencia global por año 60/100.000 habitantes. Colombia notificó a la OMS 11.480 de los 19.970 estimados, tasa de 27 por 100.000 habitantes. En el departamento del Cauca la tasa de casos notificados en el 2005 fue de 24.36 por 100.000 habitantes incrementándose en comparación con la de 1994 de 17.94 por 100.000 (7).

Dentro de las estrategias para combatir la tuberculosis, el diagnóstico subyace como uno de los pilares más importantes, debido a que permite la atención e inicio del tratamiento y en consecuencia minimiza los riesgos de contagio y dispersión de la enfermedad. (8-10)

La baciloscopia, es la técnica de oro para el diagnóstico de la tuberculosis en el laboratorio, ésta técnica diagnóstica a los enfermos con tuberculosis pulmonar bacilífera que son una fuente de diseminación de la enfermedad, y es en estos donde se han observado las mayores limitaciones, ya que son necesarias 10.000 bacterias por ml para arrojar un diagnóstico (11,12). Por otro lado el cultivo bacteriano, tiene la desventaja de tardar entre 2 y 8 semanas para arrojar un resultado positivo, lo cual repercute en incertidumbre y retraso en el diagnóstico de pacientes baciloscopia negativa, con la consecuente demora en el tratamiento, deterioro del paciente y propagación de la enfermedad. (13)

En los últimos años se ha tomado conciencia que para lograr la erradicación de la tuberculosis, es importante mejorar

nuestros métodos diagnósticos, es así como se han desarrollado nuevos sistemas de diagnóstico e identificación que permiten reducir de una manera importante el tiempo para el reporte de los resultados lo mismo que su sensibilidad y especificidad.

Este artículo pretende brindar una revisión sobre las diferentes técnicas y métodos para el diagnóstico de la tuberculosis por el laboratorio de microbiología.

BACILOSCOPIA Y TINCIONES ACIDORRESISTENTES

Uno de los métodos convencionales más rápidos para la detección de las micobacterias, es la baciloscopia, que consiste en la visualización microscópica mediante la tinción de Ziehl-Neelsen para la búsqueda de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en preparaciones obtenidas de los diferentes especímenes biológicos. Es muy útil en tuberculosis pulmonar, donde con tres baciloscopias de esputo se puede establecer la presencia de micobacterias en un 70% a un 80% (2, 4,6, 9,14).

En ésta técnica se utilizan dos tipos de coloraciones para microorganismos acidorresistentes: las coloraciones con carbolfuscina Ziehl-Neelsen (Coloración en caliente), Kinyoun (Coloración en frío); y la Coloración con fluorocromo Auramina O, con o sin un segundo fluorocromo, la Rodamina.

Coloración de Ziehl-Neelsen

La pared celular de las micobacterias confiere la singular capacidad de ligarse al colorante fuscina de modo que resiste la acción del alcohol ácido. El mecanismo de la ácido alcohol resistencia, es un mecanismo doble que requiere la penetración de la fuscina al citoplasma bacilar, así como la interacción química con los ácidos micólicos y los péptidos glicolípidos presentes en la pared celular de las micobacterias. Esta reacción impide la salida de la fuscina atrapada en el citoplasma celular, cuando es expuesta a la acción del alcohol ácido.

El papel del mordiente (solución fenolada) es definitivo porque fomenta la penetración de la fuscina y su unión con

los glucopeptidos bacilares, haciéndola más liposoluble y menos hidrosoluble. Esta reacción de tinción permite la visualización de los bacilos rojos contra un fondo azul, lo que se denomina bacilos acidorresistentes. (15)

Aunque las técnicas de Ziehl-Neelsen y Kinyoun en teoría son las mismas, la experiencia de algunos investigadores indica que la primera es más sensible para detectar micobacterias de crecimiento rápido. La sensibilidad de las tinciones acidorresistentes varía entre 40-75% (15- 17).

Existen estrategias para aumentar la sensibilidad como recolectar entre 5-10 ml de esputo, recolectar tres muestras de esputo como mínimo, en caso de tuberculosis pulmonar, debido a la liberación irregular e intermitente de estas bacterias a la luz bronquial (11, 17).

Coloración Auramina-Rodamina

La auramina-O y la rodamina son colorantes inespecíficos, fluorescentes bajo luz ultravioleta que se unen a los ácidos micólicos de las micobacterias soportando la decoloración con alcohol-ácido. Esta coloración tiene la ventaja que puede ser observadas con menor aumento de 200x y 400x, permitiendo la observación de las muestras en menos tiempo y con mayor sensibilidad en las muestras paucibacilares (18).

En la experiencia de la Corporación para la Investigación Biológica, (CIB) de Antioquia con 120 muestras en donde evaluaron la coloración de auramina-rodamina con la convencional, como Kinyoun, reportaron una sensibilidad del 96.5% y una especificidad del 98%. (19). También observaron diferencias en los tiempos de lectura, entre las dos coloraciones, donde demostraron que el tiempo de lectura se acertaba cuando se utilizaba auramina rodamina y se incrementaba con kinyu (3 min. vs. 15 min.). Estas diferencias en los tiempos de lectura no tiene un gran impacto en la oportunidad del resultado cuando se tiene mucho volumen, sino en el costo de la prueba, las cuales a largo plazo se hacen equiparables a los de las coloraciones convencionales a pesar de necesitar un equipo costoso como el microscopio de fluorescencia. La Tabla 1 expresa la comparación de los tiempos necesarios para lecturas de exámenes directos utilizando las diferentes tinciones.

Ulukanligil y col. También compararon dos métodos de tinción, la fluorescencia y el Ziehl-Neelsen en un total de 465 muestras obtenidas de 295 pacientes con el fin de determinar la sensibilidad para detectar la tuberculosis, ellos demostraron que la sensibilidad de una muestra por fluorescencia es del 83%, 2 muestras 83% y 3 muestras

92%, frente 61%, 66%, 80% respectivamente, cuando se realizaba por el método tradicional.(20).

MEDIOS DE CULTIVO

Los métodos tradicionales de cultivo emplean medios sólidos y líquidos como lo son los medios Lowesteinjensen. Kirchen, Middlebrook (7H9, 7H10 Y 7H11), Ogawa Kudoh (OK), Stonebrink modificado por Giraldo (STG).

Los medios sólidos pueden basarse en huevo o agar, además de contener suplementos antibacterianos que impidan o disminuyan el crecimiento de la microbiota acompañante. Estos requieren tres semanas en promedio para la detección del crecimiento de las micobacterias y otras 3-4 semanas para obtener las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos (11)

Los medios de cultivo líquidos logran un crecimiento más rápido con una mayor sensibilidad y se recomienda su uso en conjunto con medios sólidos para el diagnóstico rutinario de la tuberculosis. La *Sociedad Americana del Tórax* recomienda incluir siempre un medio de cultivo sólido para todos los especímenes clínicos que se sospeche contengan *Mycobacterium tuberculosis*. (21)

Este panorama ha generado la aparición de múltiples técnicas microbiológicas, radiométricas y moleculares cuya utilización permite disminuir de una manera importante el tiempo necesario para el diagnóstico. Aunque estas técnicas, por su alto costo, pueden estar fuera del alcance de mayoría de los países en desarrollo, donde se localiza el 95% de los casos de tuberculosis (2,6, 9).

Tabla 1. Comparación entre los tiempos requeridos para observar extendidos negativos coloreados con una coloración convencional y Auramina-Rodamina

CONDICIÓN	AURAMINA-RODAMINA	FUSCHINA
Aumento	400X	1000X
Máximo de campos observados	30	300
Tiempo total para observar un extendido	3 Minutos	15 Minutos
Tiempo total para 50 extendidos	2 horas con 5 minutos	12 horas con 50 minutos

MÉTODO DE CULTIVO EN CAPA DELGADA (MCD)

El medio de cultivo utilizado para el método de agar en capa delgada (MCD) es el medio Middlebrook 7H11 suplementado con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) y antibióticos. Cuando se usa éste como capa delgada, por ser un agar transparente, permite visualizar tempranamente, al utilizar un microscopio convencional, las microcolonias cuya morfología puede sugerir la especie de micobacteria que está creciendo (18, 22). Las microcolonias características de *M. tuberculosis* en la capa delgada se identifican por la morfología inicial, teniendo en cuenta la consistencia, los bordes de las colonias y la tendencia a formar cordones como se ha descrito tanto en los medios líquidos como sólidos.

El MCD resulta ser un método útil y rápido que permite detectar el crecimiento de micobacterias, acortando los tiempos de detección (aproximadamente 11 días) (23,24) los cuales son semejantes a los tiempos reportados para los medios líquidos y radiométricos. Esta técnica (MCD) no requiere de un equipamiento adicional, solamente los elementos usuales. Otra ventaja es que permite la identificación al mismo tiempo que detecta el crecimiento, debido a la morfología de las microcolonias. Es útil en laboratorios con volumen de muestras bajo o medio. Su bajo costo, su fácil implementación lo convierten en una alternativa rápida para detectar *M. tuberculosis* frente a los métodos tradicionales. (24).

SISTEMA MGIT

El sistema denominado MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube, Becton Dickinson and Company, Sparks MA, USA), es un tubo con medio líquido (Middlebrook 7H9), el cual tiene como característica tener adherida una resina en el fondo del tubo, que tiene la capacidad de fluorescer bajo la luz ultravioleta (365 nm), cuando disminuye la tensión de oxígeno en el medio, al ser éste consumido por la Micobacteria cuando está en proceso de crecimiento (25).

En este sistema, el tiempo promedio para la detección del crecimiento de la Micobacteria es de aproximadamente 13 días, tampoco utiliza elementos radioactivos y podría utilizarse en un formato manual o un formato automatizado, dependiendo del volumen de muestras de los laboratorios. (25-29) Su sensibilidad y especificidad es del 84.0%, 94.1% respectivamente. Y en muestras paucibacilares la sensibilidad se encuentra alrededor del 15.5%. (30) Su desventaja

es que por ser un medio de cultivo líquido requiere de un subcultivo en un medio sólido, para poder realizar las pruebas de identificación y de sensibilidad posteriormente. De la misma manera se ha podido demostrar que tanto el sistema MGIT o el sistema de capa delgada podrían ser utilizados para complementar la forma tradicional como se realiza el diagnóstico de la tuberculosis, aumentando su rapidez y su efectividad. (30)

SISTEMA BACTEC

Es uno de los métodos para la detección del crecimiento de micobacterias permitiendo establecer los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos. Este sistema permite inocular las micobacterias en un medio líquido el cual contiene un intermediario metabólico como el ácido palmítico marcado con C^{14} (ácido palmítico 1- C^{14}). Las micobacterias al utilizar dicho metabolito para su crecimiento, producen $C^{14}O_2$ libre, por encima de la fase líquida del cultivo en un sistema de cámara iónica. (31)

Con este sistema las muestras pueden encontrarse positivas en un período de 7 a 18 días, en comparación con 25 días de los métodos estándar. (31-34). También recupera el 91% de los aislamientos totales frente a un 73% de recuperación del medio (LJ). Al igual recupera Micobacterias no tuberculosas (MOOTT) en muestras positivas y negativas (100% vs. 83%). (31)

El sistema BACTEC es un método rápido, sensible, eficiente para el aislamiento y diferenciación de las Micobacterias, encontrándose altas tasas de aislamiento con dicho sistema; su tiempo promedio es de 15.5 días frente a 25.6 días del LJ (31-34). La desventaja es la posibilidad de transmisión de las micobacterias por escape de aerosoles debido al aumento de la presión de gas en los frascos de cultivo.

BACTEC 9000

BACTEC 9000 es un método no radiométrico fluorescente que utiliza O_2 y fluorescencia, la fluorescencia del sensor funciona cuando el oxígeno disminuye e indica crecimiento de los microorganismos. (34,35). Este sistema presenta una sensibilidad y unos tiempos de detección muy similares al sistema Bactec 460 y muy por encima del método tradicional LJ (95.1%, 92% y 69.3% ; 10.3, 10 Y 25 días respectivamente). (34)

Este sistema es recomendado en muestras pulmonares, por su alta tasa de recuperación (100%), aunque presenta una

alta tasa de contaminación (4.1%) versus BACTEC 460 (2.0%), debido a que el medio es muy enriquecido, y su volumen es muy alto (40 ml). (34,35). Pero tiene la ventaja que no utiliza materiales radiactivos.

Difco ESP culture system ii

El ESP Culture System II (ESP II; Difco Laboratories, Detroit, Mich), es un sistema automático que detecta el crecimiento del microorganismo, basado en el cambio de presión en el fondo del caldo, el cual permite medir la producción o consumo de gas por la actividad metabólica de el microorganismo cuando crece. El metabolismo de las Micobacterias es caracterizado por el consumo de oxígeno, el cual es detectado al reducir la presión en las botellas. (36, 37,38).

Al ser evaluado con otros sistemas, éste arrojó una tasa de recuperación de micobacterias del 87% con un tiempo promedio de 13 días. (36). Cuando se combina con el sistema Bactec se encuentran unas tasas de recuperación superiores y no se reportan diferencias significativas con el Bactec. La diferencia es en el volumen de muestra que puede ser inoculado (10 ml vs. 5 ml); y que este sistema presenta mejor tasas de recuperación en muestras de sangre (36-38).

Growth Indicator Tube with MB Redox

El sistema MB Redox esta suplementado con una sal de tetrazolium como indicador de crecimiento. Durante el crecimiento de la bacteria la sal de tetrazolium es reducida a rosado, rojo o violeta. También contiene un complejo vitamínico que acelera el crecimiento de las Micobacterias.

La tasa de recuperación para *M tuberculosis* es de 72.3% (29). El promedio de tiempo de detección de *M. tuberculosis* en extendidos positivos es de 6.9 días. Es un sistema rápido, sensible y fácil de manipular, y no requiere de costo adicional del instrumento. Presenta una rata de contaminación aceptable que no causa problemas, pudiendo ser utilizadas como herramientas viables en el laboratorio de Micobacteriología. (29)

BACTEC MGIT 960 System

Es un sistema automático con alta capacidad, que utiliza una fluorescencia no radioactiva, los viales de cultivo contienen un sensor fluorescente que responde a la concentración de oxígeno en el medio de cultivo por medio de un fotodetector que mide la fluorescencia cada 60 minutos. (39-41) Los niveles de fluorescencia corresponden al aumento de

oxígeno consumido por el organismo en el inoculo y es proporcional al numero de bacterias presentes.

La tasa de recuperación de Micobacterias tuberculosas (MTB) es del 96.4%. El tiempo promedio para la detección de *M. tuberculosis* en frotis positivos fue 12.6 días (26,39) para extendidos negativos fue de 15.8 días(26,39). Es un sistema mucho más rápido para la recuperación de muestras negativas y es una buena alternativa para no utilizar medios radioactivos.(26,39-41)

AMPLIACION GENÓMICA (PCR) PARA EL DIAGNÓSTICO

Está técnicas están basadas en la amplificación del genoma de las micobacterias como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual se utiliza para realizar el diagnóstico rápido. Estas pruebas son sensibles en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar paucibacilares y en la tuberculosis extrapulmonares. Su sensibilidad varia entre el 9 y el 100% y su especificidad entre el 25% y 100% (42, 43), dependiendo de diversos factores, como los oligonucleótidos iniciadores usados, el tipo de muestra, los métodos utilizados para la extracción de DNA, los métodos y protocolos para la amplificación y detección de los productos y la experiencia del laboratorio.

Esta técnica esta avalada para evaluar muestras de esputo tinción positiva, pero no se ha definido la utilidad del PCR para el diagnóstico de pacientes con tinción negativa y cultivo positivo ni tampoco en pacientes con tuberculosis bacteriológicamente negativa (42).

Infortunadamente este método tiene algunas dificultades como no diferenciar entre infección aguda, reactivación, foco inactivo o la presencia de bacilos muertos por lo cual se pueden dar muchos falsos positivos, limitando su uso (42-44)

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESION (HPCL) PARA DETERMINAR PATRONES DE ACIDOS MICÓLICOS

El análisis de los ácidos micólicos, componentes lípidos de la pared de las micobacterias, por cromatografía líquida de alta presión acoplada a un detector ultravioleta (HPLC-UV) es un método rápido de identificación a partir de cultivos ya aislados. Permite la detección a partir de 10⁵ unidades formadoras de colonias (UFC) y por lo tanto, puede em-

plearse a partir del cultivo inicial, es decir, en 2-4 semanas es posible obtener la identificación (45, 46).

Los patrones cromatográficos de los ácidos micólicos son específicos para especie, lo que permite la identificación de las distintas especies de micobacterias con un solo procedimiento de laboratorio que tarda 2 horas (proceso de extracción) y 12 minutos (separación cromatográfica), reduciendo el tiempo de identificación en 4 semanas. Esto implica la iniciación más precoz de la terapia antimicobacteriana y el más rápido control de la diseminación de la infección.

La sensibilidad de HPCL para la identificación de *M. tuberculosis* es del 97.5% y la especificidad del 100%. (47) convirtiéndose en un método rápido, reproducible, sensible y específico cuando se compara con las pruebas bioquímicas. Este método ha sido mejorado mediante la utilización de un detector de fluorescencia a cambio del ultravioleta. De esta forma, la sensibilidad se incrementa 200 veces, permitiendo la identificación de micobacterias directamente a partir de muestras clínicas o de cultivos con escaso crecimiento (48,49).

Una ventaja adicional del método HPCL es que permite diferenciar a las micobacterias de otros microorganismos que contienen ácidos micólicos en su pared tales como *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordona* y *Corynebacterium* (44,49)

MAPIA (Prueba Serológica Multiantigénica)

La posibilidad de obtener un diagnóstico serológico de tuberculosis ha sido estudiada desde mucho tiempo atrás. El primer intento por desarrollar una prueba serológica fue realizada en 1898, con una prueba de aglutinación la cual no tuvo éxito (50). Posteriormente, se identificaron y purificaron antígenos como la proteína de 65Kd (51), el antígeno 5 (52) y sustancias no proteicas como el lipoarabinomano y los glicolípidos fenólicos que al final resultaron ser inespecíficos de especie (53). Después de innumerables intentos se trató de buscar antígenos específicos de especie; los más estudiados fueron la proteína de choque térmico A60 (53) el complejo antigénico 85(54) la proteína de 38 Kd (55), el complejo antigénico 45/47 Kd (56), el antígeno de 16 Kd, (57), las proteínas ricas en glicina PE_PGRS (58) y el antígeno 85b (59).

Los resultados de las investigaciones han sido variables siendo su principal limitación la baja sensibilidad atribuida a la gran variabilidad del patrón de reconocimiento antigénico que se encuentra en los individuos, por lo tanto, las pruebas

que utilizan antígenos únicos no alcanzan los valores de sensibilidad óptimos, en consecuencia se deben utilizar combinaciones de antígenos en vez de uno. (61,62,63).

La técnica Mapia está basada en la inmovilización de una serie de antígenos dentro de una membrana de nitrocelulosa mediante microinyección semiautomática, seguida por el desarrollo de una técnica inmunocromógena que detecta la presencia de anticuerpos Ig G, cuyo resultado se obtiene por evidencias visuales, sin requerimiento de equipos. Es una técnica simple, rápida, no invasora que no requiere aislamiento ni cultivo del patógeno, y cuya lectura puede ser visualmente por una persona entrenada. (63,64) Tiene como desventaja su baja y variable sensibilidad debido a que los pacientes responden a diferentes antígenos y no existe un antígeno dominante en la tuberculosis (60,61,65). Los valores de sensibilidad y especificidad varían entre el 5%, y el 100%, el cual depende de la mezcla de antígenos que se este utilizando respectivamente, por consiguiente las combinaciones mejoran la sensibilidad hasta un 81% pero se obtienen valores de especificidad inferiores al 57%. (65) Sin embargo, no se logra discriminar entre infección y enfermedad, lo cual constituye una gran limitación de la prueba (65) considerando que en nuestro país la prevalencia de tuberculosis y de lepra son altas, y hay presencia de infecciones micobacterianas causadas por micobacterias ambientales, de modo que se hace necesario diferenciar entre infección y enfermedad.

La consecución de una prueba serológica que sea diagnóstica para tuberculosis no es fácil, esta técnica podría ser utilizada como una prueba de tamizaje más no como prueba diagnóstica confirmatoria.

TÉCNICAS MOLECULARES RECIENTES

Técnicas moleculares recientes determinan la presencia de *M. tuberculosis* por detección específica de secuencias de ácidos nucleicos después de la amplificación. La FDA (The Food and Drug Administration) ha aprobado hasta el momento solo dos técnicas, el Amplicor *M. tuberculosis* test (Amplicor; Roche Diagnostic System) y el Enhanced *M. tuberculosis* Direct Test (E-MTD; Gen-Probe, San Diego).

Al inicio ambas técnicas fueron aprobadas para usarse sólo en muestras clínicas positivas, debido a su baja sensibilidad y especificidad en muestras de pacientes baciloscopia negativa (70-80%). En 1999, con unas variaciones fue

aprobada para usarse en pacientes con baciloscopia negativa, mostrando una sensibilidad mayor al 85%.

AMPLICOR TEST

Esta técnica detecta la presencia de mycobacterial 16 S ribosomal RNA (rRNA) gen el cual es amplificado por PCR, seguido de una reacción de ELISA. Los especímenes son decontaminados con NaOH y luego se amplifica el gen 16S rRNA. La presencia de biotina labil amplicon es detectada por una reacción ELISA y medida en un fotómetro. Esta técnica reporta una especificidad del 99% y una sensibilidad del 80%-92%. (66)

E-MTD

Este ensayo es basado en la transcripción mediada por un sistema de amplificación (TMA). El mycobacterial rRNA es amplificado por TMA. EL RNA amplicon producido es detectado en solución usando luminométrico. Este ensayo se encuentra aprobado solo para muestras respiratorias. (67,68)

SISTEMA LCX (ABOTT)

Consiste en la amplificación de un producto génico por reacción en cadena de la ligasa (LCR), el cual amplifica un segmento del gen B, del cual sólo hay una copia en el genoma. Es específico para miembros del complejo *Mycobacteria* y tiene una sensibilidad del 97-99% y una especificidad del 90 al 100%. (69).

CONCLUSIONES

En los últimos años se ha producido un vertiginoso avance en las técnicas diagnósticas de la tuberculosis. La aparición del virus de la inmunodeficiencia humana ha despertado más el interés en ellas, dado que contribuye a incrementar la incidencia de la tuberculosis en el mundo. Es así como el diagnóstico se convierte en la piedra angular dentro de la lucha contra la tuberculosis, aunque se ha demostrado que en el periodo comprendido entre la consulta y el diagnóstico se pierden alrededor del 40% de los casos.

De otra parte los avances tecnológicos y la variabilidad de las pruebas de diagnóstico, se encuentran en los países desarrollados en contraste con los países en vías de desarrollo

o subdesarrollados, donde se concentra el mayor porcentaje de enfermos que no pueden acceder a dicha tecnología. Por consiguiente, se hace indispensable implementar nuevos métodos, en los laboratorios de micobacteriología que garanticen precisión, bajo costo oportunidad de acceso a toda la población, sin que los costos sean muy altos.

REFERENCIAS

1. **Raviglione mc, DE Jr, Korchi A.** Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemia. *JAMA* 1995; 273: 220-226.
2. **World Health Organization.** Global tuberculosis control – surveillance planning, financing WHO Report 2007. WHO/HTM/TB/2007.376. Consultado en http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007/en/
3. **Bloom BR.** Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 1994; p 637.
4. **Young P. White House to Expand responses to Infectious Diseases.** *ASM News* 1996; 62:450-453.
5. **Sneider DE Jr, Roper WL.** The new tuberculosis. *N Engl. J. Med* 1992; 326: 703 -709.
6. **World Health Organization.** Global tuberculosis Control. Sueveillance, Planning, Financing. WHO Report 2003. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/2003.316.
7. **Dirección Departamental de Salud del Cauca.** Programas especiales. Archivos estadísticos de tuberculosis. 1994-2002.
8. **Guías para el manejo de la tuberculosis.** Ministerio de Salud, Colombia. 2000.
9. **Centers for Disease Control and Prevention.** Guidelines for preventing the transmisión of *Mycobacterium tuberculosis* in health care facilities. *MMWR. Morb Mortal Wkly Rep* 1994; 43 (13); 1-132.
10. **Hale IM, Pfyfer GE, Salfinger M.** Laboratory diagnosis of mycobacterial infections. New tools and lessons leamed. *Clin Infect. Dis* 2001; 33;834-846.
11. **Mandel G L, Bennett J E and Dolin R eds.** Principles and practice of Infectious Diseases, 5a Ed. N.Y. Churchill Livingstone Inc., 2000. p. 2576-2578.
12. **David H L.. Bacteriology of mycobacteriosis.** Government Printing Office, Washington, D.C. 1976; p. 1-20 .
13. **Snider GI.** Tuberculosis then and now: a personal perspective on the last 50 years. *Ann Inter Med.* 1997; 126: 237-243.
14. **Malin AS, McAdam KPWJ.** Escalating Threat from tuberculosis: the third epidemic. *Thorax* 1995; 50 (suppl 1): s37-42.

15. **Manual del taller Manejo de muestras para investigación de *Mycobacterium tuberculosis* en baciloscopia y cultivo.** Instituto Nacional de Salud. Dirección departamental de Salud. División de Salud Pública. Programa de tuberculosis. 2000.
16. **Peterson EM, Nakasone A, Platon-De Leon JM, Jang Y, de La Maza LM, Desmond E.** Comparison of direct and concentrated acid-fast smears to identify specimens culture positive for *Mycobacterium* spp. *J Clin Microbiol* 1999; 37(11): 3564-8.
17. **Warren JR, Bhattacharya M, De Almeida KN, Trakas K, Peterson LR.** A minimum 5.0ml of sputum improves the sensitivity of acid-fast smear of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(5): 1559-62.
18. **Wright PW, Wallace RJ Jr, Wright NW, Brown BA, Griffith DE.** Sensitivity of fluorochrome microscopy for detection of *Mycobacterium tuberculosis* versus nontuberculous mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(4):1046-9.
19. **Robledo J, Mejía GI.** Actualidad en el diagnóstico de tuberculosis por el laboratorio. *Infectio* 2001; 5:251-259.
20. **Uluhanligil M, Aslan G, Tasci S.** A comparative study on the different staining methods and number of specimens for the detection of acid-fast bacilli. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95(6):855-8
21. **American Thoracic Society.** Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1376-95.
22. **Welch DF, Guruswamy AP, Sides SJ, Charles HS, Gilchrist MJ.** Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2178-2184.
23. **Mejía GI, Catrillón L, Trujillo H, Robledo J.** Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:138-142.
24. **Mejía GI, Guzmán A, Agudelo CA, Trujillo H, Robledo J.** Cinco años de experiencia con el agar de capa delgada para el diagnóstico rápido de tuberculosis. *Biomédica.* 2004;24:52-9.
25. **BACTEC MGIT 960 System User's Manual.** Becton Dickinson and Company. Sparks, Maryland. May 1999.
26. **Alcaide F, Benitez MA, Escriba JM, Martín R.** Evaluación Bactec MGIT 960 and MB/Bact System for recovery of *Mycobacteria* from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe. *J Clin Microbiol* 2000;38: 398-400.
27. **Somaskövi A, Ködmón C, Lantos A, Bartfai Z, Tamási L, Füzy J, Magyar P.** Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated BACTEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system and Lowenstein-jensen medium. *J Clin Microbiol* 2000;38:2395-2397.
28. **Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutierrez J, Gerdes SR.** Comparison of the *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT) With Radiometric and Solid Culture For Recovery of Acid-Fast Bacilli. *J Clin Microbiol* 1997;35:364-368.
29. **Somaskövi A, Magyar P.** Comparison of the *Mycobacteria* Growth Indicator Tube with MB Redox, Lowenstein-Jensen, and Middlebrook 7H11 Media for Recovery of *Mycobacteria* in Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1366-1369.
30. **López LM, Veles CI, Zuluaga LM, Mejía GI, Estrada S, Posada P, Moreno S, Guzmán A, Robledo J.** Evaluación de medios de cultivo alternativos para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar. *Infectio* 2001; 5(4):235-240.
31. **Aanrgyros Meter, Astill D, Lim I.** Comparison of improved BACTEC and Lowenstein-Jensen Media for Culture of *Mycobacteria* from Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 1990;28:1288-1291.
32. **Morgan, M.A.,C.D. Horstmeier, D.R. De Young, and G.D. Roberts.** Comparison of radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for the recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. *J Clin Microbiol* 1983;18:384-388.
33. **Park, C.H.,D. L. Hixon, C.B. Ferguson, S. L. Hall, C. C. Risheim, and C.B. Cook.** Rapid recovery of mycobacteria from clinical specimens using automated radiometric technique. *Am J Clin Pathol* 1984;81: 341-345.
34. **Zanetti S, Ardito F, Sechi L, Sanguinetti M, Molicotti P, Delogu G, Pinna MP, Nacci A, Fadda G.** Evaluation of Nonradiometric System (BACTEC 9000 MB) for Detection of *Mycobacteria* in Human Clinical Samples. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2072-2075.
35. **Van Griethuysen, a. j., A.R.Jansz, and A.G.M, Buiting.** Comparison of fluorescent BACTEC 9000 MB System, Septi-Chek AFB System, and Lowenstein-Jensen medium for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2391-2394.
36. **Gail L.W, Fish G, Plaunt M, Murphy T.** Clinical Evaluation of Difco ESP Culture System II for Growth and Detection of *Mycobacteria*. *J Clin Microbiol* 1997;35:121-124.
37. **Tortoli E, Cichero P, Chirillo MG, Gismondo MR, Bono L, Gesu G, Simonetti MT, Volpe G, Nardi G, Marone Piero.** Multicenter Comparison of ESP Culture System II with BACTEC 460TB and with Lowenstein-Jensen Médium for Recovery of Myco-

- bacteria from Different Clinical Specimens, Including Blood. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1378-1381.
38. **Tholcken, C.A., S. Huang, and G.I. Woods.** Evaluation of the ESP Culture System II for recovery of mycobacteria from blood specimens collected in Isolator tubes. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2681-2682.
 39. **Alcaide F, Benitez MA, Escriba JM, Martin R.** Evaluation of the BACTEC MGIT 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.
 40. **Hanna, B.A., A. Ebrahimzadeh, B. Elliot, M.A. Morgan, S.M. Novak, S. Rusch-Gerdes, M. Acio, D.F. Dumbar, T.M. Holmes. C.H. Rexer, C. Savthayakumar, and A. M. Vannier.** Multicenter evaluation of the Bactec MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 748-752.
 41. **Tortoli, E., P. Cichero, C. Piersimoni, M. T. Simonetti, G. Gesu, and D. Nista.** Use of Bactec MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3578-3582.
 42. **Sarmiento O L, Weigle K A, Alexander J, Weber D J and Miller W C.** Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J Microbiol* 2003; 41: 3233-3240.
 43. **Scarpato P, Piccoli A, Rigon G, Ruggiero M, Scagnelli c, Piersimoni.** 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: 1559-1562.
 44. **Doern GV.** Diagnostic mycobacteriology: where are we today?. *J Clin Microbiol* 1996; 33 1873-1876.
 45. **Master RN.** Mycobacteriology in: Clinical microbiology procedures handbook. Washington, D. C.: American Society for Microbiology; 1992. p 301-316.
 46. **Nolte FS.** *Mycobacterium*. In: Manual of clinical microbiology. 6th.ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.1995; p 400-435.
 47. **Munera MI, Zapata EM, Castrillón I, Mejía GI, Robledo J.** Identificación de *Mycobacterium tuberculosis* mediante el análisis del perfil de ácidos micólicos por cromatografía líquida de alta presión (HPCL). *Biomédica* 1997; 17: 62-66.
 48. **Jost KC, et al.** Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *M.avium* complex directly from smear positive sputum specimens and BACTEC 12B cultures by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and computer-driven pattern recognition models. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1270-1277.
 49. **Glickman SE, Kilburn JO, et al.** Rapid identification of mycolic acid patterns of mycobacteria by high performance liquid chromatography using pattern recognition software and a *Mycobacterium* library. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 740-745.
 50. **Daniel TM, Debanne SM.** The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1137-1151.
 51. **Shinnick JM, Vadkin MH, Williams JL.** The *Mycobacterium tuberculosis* 65kd protein is a heat shock protein is a heat shock protein which correspondes to common antigens and to the *E. Coli* protein. *Inf Immun* 1988; 6: 446-451.
 52. **Balestrino E, Daniel T, De latini MDS, Latini OA, Ma Y, Scocozza JB.** Serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Argentina by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of Ig G antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and tuberculin Dpurified protein derivate. *Bull WHO* 1984; 62: 755-762.
 53. **Maes R.** Clinical usefulness of serological measurements obtained by antigen 60 mycobacterial infections: development of new concept. *Klin Wochenschr* 1991; 69: 697-709.
 54. **Chan ED, Heifets I, Iseman MD.** Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *Tuber Lungs Dis* 2000; 80: 131-140.
 55. **Espitia C, González R, Mancilla R.** A 38-kDa of *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection, its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp inmunol* 1989; 77: 373-377.
 56. **Diagbouga S, Fumoux F, Zoubga A, Sanou PT, Marchal G.** Immunoblot analysis for serodiagnosis of tuberculosis using a 45-47 kDa antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4: 334-338.
 57. **Raja A, Devi U, Ramalingam B, Brennan J.** Immunoglobulin G, A, and M responses in serum and circulating immune complexes elicited by the 16-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 308-312.
 58. **Espitia C, Lacleste JP Mondragón- Palomino M, Amador A, Campuzano J, Martens A et al.** The PE-PGRS glycine-rich proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: a new family of fibronectin-binding proteins?. *Microbiol* 1999; 145: 3487-3495.
 59. **Singh x, Patibandla P, Chien Jr, Laal S.** Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* expressed during pre-clinical tuberculosis: serological immunodominance of proteins with repetitive amino acid sequences. *Infect Immune* 2001; 69: 4185-91.
 60. **Espitia C, Sciutto E, Bottasso O, González- Amaro**

- R, Hernández-Pando, Mancilla R.** High antibody levels to the mycobacterial fibronectin-binding antigen of 30-31 kDa in tuberculosis and lepromatous leprosy. *Clin Exp Immunol* 1992; 87: 362-367.
61. **Gennaro L.** Immunological diagnosis of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2000; 30(Suppl.3): 243-246.
62. **Lyashchenko K, Manca C, Colangeli R, Heijbel A, Williams A, Gennaro M.** Use of *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific antigen cocktails for a skin test specific for tuberculosis. *Infect Immun* 1998; 66: 3606-3610.
63. **Lyashchenko K, Mewa S, Singht M, Colangeli R, Gennaro M.** A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *J Immunol Methods* 2000; 242: 91-100.
64. **Houghton R, Lodes M, Dillon D, Reynolds L, Day C, McNeill P.** Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 883-891.
65. **Castro CM, Porras TB, Guerrero MI, León CI, Mojica MA, Lara M, Parada MC, Espitia C.** Utilidad de una prueba serológica multiantigénica en el diagnóstico de la tuberculosis. *Biomédica* 2005; 25:55-64.
66. **Stauffer F, Mutschlechner R, Hasenberg P, Stadlbauer S, Schinko H.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical specimens by a commercial polymerase chain reaction kit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 1046-51.
67. **Center for Disease Control and Prevention.** Update: nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *Morb Mortal Wkly Rep* 2000; 49: 593-594.
68. **Scarpato C, Picoli P, Rigon A, Ruggiero G, Scagnelli M, Piersimoni C.** Comparison of enhanced *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct 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.
69. **Fadda G, Ardito F, Sanuineti M, Posteraro B, Ortonal L, Chezzi C, et al.** Evaluation of the Abbot LC *Mycobacterium tuberculosis* assay in comparison with culture methods in selected Italian patients. *New Microbiol* 1998; 21: 97-103