



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Medicina



**Germans Trias i Pujol
Hospital**

Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

de Badalona (Barcelona)



**Institut Català
de la Salut**

**“NUEVAS APORTACIONES AL DIAGNÓSTICO DE LAS
ENFERMEDADES CAUSADAS POR LAS MICOBACTERIAS”**

Joxe Mari Manterola Martija

Badalona 2004



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Medicina



**Germans Trias i Pujol
Hospital**

Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

de Badalona (Barcelona)



**Institut Català
de la Salut**

“NUEVAS APORTACIONES AL DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES CAUSADAS POR LAS MICOBACTERIAS”

Memoria presentada por Joxe Mari Manterola Martija
para optar al grado de Doctor
por la Universitat Autònoma de Barcelona

VºBº del Director de la Tesis

VºBº del Codirector de la Tesis

Dr. Vicente Ausina Ruiz

Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
Universitat Autònoma de Barcelona

Dr. Juan Ruiz Manzano

Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
Universitat Autònoma de Barcelona

Nere ama,
Loles, Ainhoa eta Uxuari
bihotz-bihotzez
eta
nere aitaren homenez

A mi madre,
Loles, Ainhoa y Uxua
de todo corazón
y
en homenaje a mi padre

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Vicente Ausina Ruiz por la dirección de esta Tesis, por su confianza y por su dedicación científica y capacidad de trabajo, ejemplo para todos.

Al Dr. Joan Ruiz Manzano por su ayuda al codirigir esta Tesis y por su cariño y amistad, mostrada durante tantos años.

Al Dr. Joan Arnal Millán, con el que he compartido muchos años de esfuerzo en el hospital.

Al Dr. C. Thornton, promotor de los estudios sobre el CB-18.

A todos los compañeros y amigos del Servicio de Microbiología del "Hospital Universitari Germans Trias i Pujol" de Badalona por su compañerismo y amistad durante estos años, así como por su dedicación al trabajo.

A todos los compañeros del "Hospital Universitari Germans Trias i Pujol" de Badalona

ARTÍCULOS EN LOS QUE SE BASA ESTA TESIS

La presente Tesis Doctoral se basa en los artículos que se describen a continuación:

- I. Comparison of the sodium dodecyl sulfate-sodium hydroxide specimen processing method with the C₁₈-carboxypropylbetaine specimen processing method using the MB/BacT liquid culture system. Manterola JM, Thornton CG, Padilla E, Lonca J, Corea I, Martínez E, Ausina V. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22:35-42
- II. Analisis of the contaminant spectrum in the MB/BacT liquid culture System following C₁₈-carboxypropylbetaine specimen processing. Manterola JM, Thornton CG, Padilla E, Lonca J, Pérez M, Quesada MD, Ausina V. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003;22:507-508
- III. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin-embedded pleural biopsy specimens by commercial ribosomal RNA and DNA amplification kits. Ruiz Manzano J, Manterola JM, Gamboa F, Calatrava A, Monsó E, Martínez C, Ausina V. Chest 2000;118:648-655

Como documentación complementaria se adjunta:

- IV. Comparison of a nonradiometric system with BACTEC 12B and culture on egg-based media for recovery of mycobacteria from clinical specimens. Manterola JM, Gamboa F, Padilla E, Lonca J, Matas L, Hernández A, Giménez M, Cardona PJ, Viñado B, Ausina V. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17:773-777

ÍNDICE

| | |
|---|----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 1.1. Introducción histórica al estudio de las micobacterias | 10 |
| 1.2. Situación actual de las micobacterias en el mundo | 12 |
| 1.3. Métodos microbiológicos para el diagnóstico de las infecciones por micobacterias | 19 |
| 1.3.1. <u>Evolución de las técnicas de diagnóstico de las micobacterias...</u> | 19 |
| 1.3.1.a. Primera etapa de las técnicas diagnósticas..... | 19 |
| 1.3.1.b. Segunda etapa..... | 22 |
| 1.3.1.c. Tercera etapa..... | 23 |
| 1.3.2. <u>Técnicas de diagnóstico de las micobacterias</u> | 24 |
| 1.3.2.a. Observación microscópica de las micobacterias tras tinciones realizadas de extensiones de las muestras clínicas..... | 24 |
| 1.3.2.b. Diagnóstico de las micobacterias mediante diferentes técnicas de amplificación genética de ácidos nucleicos..... | 26 |
| 1.3.2.c. Aislamiento de las micobacterias mediante el cultivo en medio sólido o líquido..... | 33 |
| 1.3.2.c.1. Concentración y descontaminación de las muestras. | 33 |
| 1.3.2.c.2. Medios de cultivo de micobacterias..... | 35 |
| 1.3.2. d. Identificación de las micobacterias aisladas..... | 44 |
| 1.3.2.d.1. Identificación clásica convencional..... | 44 |
| 1.3.2.d.2. Identificación cromatográfica..... | 45 |
| 1.3.2.d.3. Identificación genotípica..... | 45 |
| 1.3.2.e. Estudio de la sensibilidad "in vitro" de <i>M.tuberculosis</i> a los quimioterápicos..... | 49 |
| 1.3.2.f. Estudio de la sensibilidad "in vitro" de las micobacterias ambientales a los quimioterápicos..... | 57 |
| 1.3.2.g. Aplicación de técnicas de biología molecular en estudios epidemiológicos de la tuberculosis..... | 59 |

| | |
|--|-----------|
| 1.3.3. ¿Qué debe ofrecer hoy en día el laboratorio de micobacteriología? | 62 |
| 2. OBJETIVOS Y CONTENIDO DE LA TESIS | 65 |
| 2.1 Justificación y objetivos..... | 66 |
| 2.2 Utilidad de nuevas técnicas de descontaminación para el cultivo de micobacterias. Estudio de la descontaminación de las muestras mediante el procesamiento con CB ₁₈ -carboxypropylbetaine..... | 71 |
| 2.3 Utilidad de técnicas de amplificación de DNA y RNA en muestras de tejido pleural parafinado para el diagnóstico de la tuberculosis pleural | 74 |
| 2.4 Eficacia del sistema de cultivo líquido no radiométrico MB-BacT [®] en el cultivo de micobacterias | 75 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 77 |
| 3.1 Utilidad de nuevas técnicas de descontaminación para el cultivo de micobacterias. Estudio de la descontaminación de las muestras mediante el procesamiento con CB ₁₈ -carboxypropylbetaine..... | 78 |
| 3.2 Utilidad de técnicas de amplificación de DNA y RNA en muestras de tejido pleural parafinado para el diagnóstico de la tuberculosis pleural..... | 81 |
| 3.3 Eficacia del sistema de cultivo líquido no radiométrico MB-BacT [®] en el cultivo de micobacterias..... | 83 |

| | |
|--|------------|
| 4. CONCLUSIONES | 85 |
| 4.1 Utilidad de nuevas técnicas de descontaminación para el cultivo de micobacterias. Estudio de la descontaminación de las muestras mediante el procesamiento con CB-18 carboxypropylbetaine..... | 86 |
| 4.2 Utilidad de técnicas de amplificación de DNA y RNA en muestras de tejido pleural parafinado para el diagnóstico de la tuberculosis pleural..... | 88 |
| 4.3 Eficacia del sistema de cultivo líquido no radiométrico MB-BacT [®] en el cultivo de micobacterias | 89 |
| 5. BIBLIOGRAFÍA..... | 91 |
| 6. ARTÍCULOS..... | 106 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA AL ESTUDIO DE LAS MICOBACTERIAS

La tuberculosis es una enfermedad conocida desde tiempos inmemoriales. Se han encontrado momias egipcias afectas de lesiones tuberculosas óseas. En la Edad Media fue descrita como la "peste blanca", en contraposición a la peste negra que asoló Europa.

Villemin en 1865 demostró que era una enfermedad transmisible. Para ello, inoculó muestras procedentes de pacientes tuberculosos a cobayas y conejos y produjo lesiones tuberculosas en estos animales.

Robert Koch en 1882 fue capaz de teñir y de cultivar el bacilo tuberculoso de muestras procedentes de pacientes tuberculosos, poniendo las bases del diagnóstico micobacteriológico. El bacilo fue después denominado *Mycobacterium tuberculosis* y es conocido también como "bacilo de Koch".

Posteriormente, se cultivaron micobacterias con características diferentes al bacilo tuberculoso típico, por lo que se denominaron como micobacterias "atípicas". Estas micobacterias han recibido diferentes nombres a lo largo del pasado siglo: micobacterias anónimas, no tuberculosas, oportunistas o ambientales. Runyon¹ intentó sistematizar su identificación y las agrupó según su velocidad de crecimiento y su respuesta a la exposición a la luz.

La tuberculosis se trata con fármacos diferentes a los normalmente utilizados en el tratamiento de otras infecciones bacterianas. Fueron Canetti, Rist i Grosset² quienes estandarizaron y describieron el "método de las proporciones" para conocer la sensibilidad de las cepas de *M.tuberculosis*.

En los últimos años se ha experimentado un importante desarrollo de las técnicas de diagnóstico de micobacterias, como son la implantación de la amplificación génica, el empleo de sistemas automatizados de cultivo en

medio líquido de micobacterias y la posibilidad de detección rápida de la sensibilidad a los quimioterápicos.

1.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LAS INFECCIONES POR MICOBACTERIAS EN EL MUNDO

La tuberculosis continúa siendo una infección muy prevalente en el mundo actual. Se considera que actualmente está infectada la tercera parte de la población mundial por tuberculosis, que cada año ocurren 8-9 millones de casos nuevos de tuberculosis y que ésta causa entre 2 y 3 millones de muertes anualmente. En los últimos años ha habido un incremento del número de casos de tuberculosis y de tasa de incidencia en el mundo, excepto en Europa occidental y América del Norte³. La denominada peste blanca continúa siendo hoy en día una enfermedad directamente relacionada con la pobreza y con las malas condiciones socio-sanitarias^{4,5}, con la guerra y con la inmunosupresión e inmunodeficiencia.

El 85-90 % de los casos de tuberculosis se dan en países en vías de desarrollo, que carecen de sistemas de salud adecuados y donde la población no puede acceder a los tratamientos recomendados actualmente, en parte debido a la carestía de los mismos (rifampicina). Por ello, frecuentemente las pautas de tratamiento no son las adecuadas, a menudo son monoterapias, y se desarrollan resistencias. Es bien conocido que en los países occidentales los porcentajes de resistencia primaria a los quimioterápicos antituberculosos son muy bajos. Así, en estos países los porcentajes de resistencia primaria a la isoniazida son inferiores al 4%⁶. En los países en vías de desarrollo estos índices de resistencia son muy superiores, siendo relativamente frecuentes los porcentajes de resistencias primarias superiores al 40%.

En la década de los 80 irrumpió la epidemia del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (sida), causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)⁷. El sida causa un deterioro importante de la inmunidad, tanto celular como humoral, aunque fundamentalmente una inmunodeficiencia de tipo celular. Esta inmunodeficiencia facilita extraordinariamente la aparición de

infecciones en la persona afecta. Estas infecciones ocurren fundamentalmente por microorganismos intracelulares, como *Pneumocystis carinii*, *M.tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complex y diferentes virus. Se estima que actualmente hay en el mundo unos 40 millones de personas infectadas por el HIV, un tercio de las cuales tiene coinfección por *M.tuberculosis*. Hoy en día, el 90% de las personas infectadas por el HIV viven en países del tercer mundo. La mitad de la población infectada por el HIV son mujeres en algunos países del África subsahariana.

La coinfección del sida y la tuberculosis y otras infecciones micobacterianas tiene efectos devastadores en la población de estos países del tercer mundo. Se puede estimar que el número de personas coinfectadas por el HIV y la tuberculosis es de unos 15 millones de personas. La tuberculosis es la infección oportunista más frecuente en pacientes con sida en el mundo. La mortalidad que causará en estos países pobres comprometerá seriamente la posibilidad de un resurgir económico y de salir de la pobreza y situación sanitaria actuales. Se ha podido comprobar que la tuberculosis en los pacientes con HIV tiene unas características particulares. La tuberculosis aparece relativamente pronto en el curso de la infección con el HIV, cuando el paciente tiene entre 200 a 300 CD4/mcL. Se considera que la enfermedad tuberculosa se presenta como una reactivación endógena, aunque numerosos estudios sugieren que la frecuencia de tuberculosis por infección reciente es mucho mayor que en la población HIV-negativa⁸. En las personas coinfectadas la probabilidad de dar lugar a la enfermedad tuberculosa era del 2-10 % por año (antes de la introducción del tratamiento con inhibidores de las proteasas), muy superior al 10% a lo largo de la vida estimada para los pacientes HIV-negativos. Se aprecia un porcentaje importante (60%) de tuberculosis diseminadas o extrapulmonares y afectación pulmonar con infiltrados difusos o miliares, a diferencia de los infiltrados focales y/o cavitados de los pacientes sin HIV. La respuesta a los fármacos antituberculosos suele ser buena, pero los efectos adversos a los quimioterápicos se manifiestan más a menudo que en los pacientes sin HIV⁹.

Otro problema que se manifestó a finales de los 80 fue la aparición de brotes de tuberculosis multirresistente en diferentes tipos de instituciones como son las sanitarias, socio-sanitarias o prisiones. Estos brotes eran debidos a infección reciente y se caracterizaban por la rápida progresión a la enfermedad y su elevada mortalidad. Estos brotes han afectado principalmente a personas ingresadas o reclusas, pero también a personal sanitario, infectadas con el HIV. Estos brotes de tuberculosis multirresistente se han notificado en numerosos países. Son de destacar los descritos en Florida o Nueva York, por la denominada cepa W de *M.tuberculosis*¹⁰. Los Centers for Disease Control and Prevention (CDCP) hicieron el seguimiento y descripción de estos brotes y posteriormente describieron las normas a tener en cuenta para la prevención de brotes similares¹¹. Estas cepas multirresistentes causaban frecuentemente infección diseminada, peor respuesta al tratamiento standard, con incapacidad de erradicar el bacilo y una importante mortalidad (90%). Resaltaron las claves principales para evitar la transmisión de la tuberculosis multirresistente y agruparon las recomendaciones en aspectos de control administrativo de los enfermos, medidas de control de arquitectura de los edificios y habitaciones y medidas de protección respiratoria del personal. Por una parte, debe asegurarse que los pacientes con tuberculosis sean diagnosticados lo más rápidamente posible y que toman correctamente la medicación, haciendo uso si hace falta de programas de tratamiento directamente observado. Por otra parte, el laboratorio ha de aislar el bacilo tuberculoso y conocer su sensibilidad con métodos modernos (microscopia fluorescente, métodos rápidos de cultivo y de test de sensibilidad). El paciente diagnosticado debe ser ingresado en habitación con aislamiento respiratorio. Cuando se conozca la sensibilidad de la cepa causante de la tuberculosis el paciente debe ser tratado de acuerdo a la sensibilidad de la cepa de *M.tuberculosis*¹². Frieden y cols¹³ muestran cómo en la ciudad de Nueva York disminuyeron los casos de tuberculosis tras establecerse eficaces programas de control, incluyendo el diagnóstico rápido y el tratamiento adecuado. Weinsten y cols.¹⁴ concluyeron que las guías emitidas por los CDCP son útiles en el control de la tuberculosis multirresistente y deben ser implantadas en todos los centros sanitarios y en la comunidad.

La tuberculosis decrece en los países occidentales claramente desde principios del siglo XX. Este descenso de incidencia ocurría ya antes de la instauración de la quimioterapia antituberculosa en las décadas 50-60. Se estima que el riesgo anual de infección decreció el 5,4% anualmente en Holanda entre los años 1910 y 1939. El control de la tuberculosis se basa en el diagnóstico, en el tratamiento y en la prevención, siendo la quimioterapia la mejor arma para la lucha antituberculosa y el descenso de la tuberculosis ha sido más manifiesto desde la instauración de la quimioterapia. La aparición de la infección por el HIV paró este descenso y hubo un rebrote de casos desde el año 1984 hasta el año 1994. Desde el año 1994 la tuberculosis en los países occidentales ha vuelto a descender a tasas inferiores a las del 1984. La introducción hacia el año 1994 de fármacos inhibidores de las proteasas ha permitido decrecer la carga viral del HIV, el aumento subsiguiente de linfocitos T4 y una mejora de la inmunidad que evita la enfermedad tuberculosa en las personas infectadas por el HIV. Se estima que el riesgo anual de infección en muchos países del mundo occidental es ahora inferior al 0,1%. Por el contrario, en los países africanos oscila entre el 2-5% y no parece que decline a lo largo de los años¹⁵.

Uno de los nuevos retos de los países occidentales en el control de la tuberculosis es la incidencia de ésta en la población inmigrante y su control. La tuberculosis en los países europeos más evolucionados y en Estados Unidos de América (USA) se presentaba de manera importante en la población inmigrante. La incidencia de tuberculosis en la población nacida fuera de USA era de 30,6/100.000 en vez del 8,1/100.000 en la población nativa y en el año 1993 suponía ya el 29,6% de toda la tuberculosis del país¹⁶. Este mismo fenómeno se observa en los últimos 5 años en España, donde el 20-30% de la tuberculosis ocurre ya entre la población inmigrante¹⁷. Por lo tanto, las políticas de control y prevención de la tuberculosis han de tener en cuenta esta nueva situación.

La aparición de tuberculosis en pacientes con HIV, de cepas multirresistentes en diferentes países¹⁸ y de brotes de tuberculosis multirresistente en instituciones

cerradas¹⁹ ha llevado a denominarlas como la "nueva tuberculosis"²⁰ con características clínicas diferentes a la tuberculosis clásica, previamente conocida. En general, y siguiendo a Mitchinson y col²¹ se piensa que las cepas resistentes a la isoniazida tienen una menor virulencia y por tanto una capacidad menor de infectar a nuevas personas. Sin embargo, se han encontrado cepas resistentes, como la cepa W multirresistente descrita en Nueva York²² y cepas de brotes en Sudáfrica²³, que evidencian que, al menos algunas cepas, pueden ser transmitidas tan fácilmente como las cepas sensibles.

Ante estos nuevos retos, la "nueva tuberculosis"²⁰, el laboratorio de micobacterias ha de optimizar sus recursos para permitir el diagnóstico más rápido posible de los nuevos casos de tuberculosis^{24,25}.

Como ya señaló Runyon¹ el año 1959 hay micobacterias diferentes a las del bacilo tuberculoso y se las ha denominado de diversas maneras (atípica, anónimas, no tuberculosa, ambientales, oportunistas, etc.). Son micobacterias que se encuentran en el medio ambiente (agua, suelo, etc.) y cuando las aislamos de una muestra clínica están como comensales frecuentemente. En ocasiones, pueden causar infecciones en diversas localizaciones como ya indicó Wolinsky²⁶ el año 1979. Principalmente causan infecciones pulmonares, úlceras, escrófulas cérvico-faciales, infecciones diseminadas, o infecciones localizadas. Las especies que producen infección pulmonar son *M.kansasii*, *M.avium-M.intracellulare*, *M.xenopi*, *M.malmoense*, *M.szulgai*, *M.simiae* o *M.fortuitum*. Normalmente causan enfermedad en personas adultas de más de 50 años, varones y con enfermedades predisponentes como tuberculosis previa, silicosis, etc. *M.kansasii* es la más frecuente en personas inmunocompetentes, y se han encontrado ciertas variaciones geográficas (*M.malmoense* en el Reino Unido y Escandinavia). La úlcera de Buruli, causada por *M.ulcerans*, se ha descrito en África, como una causa importante de úlceras incapacitantes. Las adenopatías cérvico-faciales en niños de menos de 7 años son causadas mayoritariamente por *M.scrofulaceum* y *M.avium-M.intracellulare* complex. Su tratamiento consiste en la exéresis. Las infecciones diseminadas en pacientes con sida u otras

inmunodeficiencias son debidas a *M.avium-M.intracellulare*, *M.genavense*, *M.kansasii* y *M.haemophilum*, además de *M.tuberculosis*. Ocurren, en general, en pacientes con menos de 50 CD₄/mL. Las infecciones cutáneas o articulares lo son, en general, por micobacterias de crecimiento rápido (*M.fortuitum*, *M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.mucogenicum*) y por *M.kansasii*. Numerosas especies de micobacterias se aíslan como simples contaminantes de las muestras (*M.gordoniae*, micobacterias cromógenas de crecimiento rápido, etc.). Antes de instaurar un tratamiento hay que asegurarse que el paciente tiene realmente una enfermedad producida por la micobacteria, y que ésta no se encuentre como colonizante de la muestra. Se han publicado las condiciones de diagnóstico y tratamiento de las micobacterias ambientales por la ATS²⁷. En líneas generales, podemos asegurar que, hoy en día, representan el 20-30 % de los aislamientos de un laboratorio clínico y suponen el 5-10% de los enfermos por micobacterias. Es importante conocer la identificación de la especie aislada, para poder valorar si está causando o no enfermedad y, por lo tanto, para saber si el paciente requiere o no tratamiento quimioterápico²⁷.

La situación de la tuberculosis en España y Cataluña es intermedia entre la observada en los países occidentales (Holanda, Suecia, etc.) y la situación en los países del tercer mundo. A lo largo del siglo pasado el descenso en la incidencia de la tuberculosis fue inferior al de los otros países europeos²⁸. Con la introducción de la quimioterapia se mantuvo la diferencia con otros países europeos en el control de la endemia tuberculosa. El Plan Nacional Antituberculoso tuvo la virtud de concienciar de la necesidad de controlar la tuberculosis. La mejora de la calidad de vida, la mejor preparación del personal médico, la mejora de los recursos sanitarios han permitido, por fin, lograr avances en la lucha antituberculosa en los últimos años. El descenso en la incidencia de casos se rompió al aparecer el HIV, y desde el año 1984 hasta el año 1994 aumentó la incidencia de tuberculosis. La introducción de las pautas HAART anti-HIV han permitido disminuir la tuberculosis en pacientes HIV-positivos y con la mejora en los programas de control y tratamiento en la población general se ha conseguido reducir las tasas de incidencia de

19,64/100.000 habitantes el año 2000, cuando la tasa estimada el año 1994 era de 60/100.000. Sin embargo, hemos de recordar que actualmente España tiene la segunda tasa de incidencia más alta después de Portugal en la Europa occidental según la Red de Vigilancia Europea de Tuberculosis (Euro TB)²⁹.

La situación en España, respecto a las micobacterias ambientales, es similar a la descrita para el mundo en general. Destacan *M.kansasii* y *M.xenopi* (en el área mediterránea) como causa de infección pulmonar, *M.scrofulaceum* y *M.avium* complex como causa de adenitis en niños, *M.marinum* como causante del granuloma de las piscinas, *M.avium* complex y *M.tuberculosis* como causantes de infección diseminada en pacientes con sida y las micobacterias de crecimiento rápido en infecciones cutáneas y de tejidos blandos.

1.3. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR MICOBACTERIAS

Este apartado lo subdividiremos en 3 subapartados:

1. Evolución de las técnicas de diagnóstico de las micobacterias
2. Técnicas de diagnóstico de las micobacterias
3. ¿Qué debe ofrecer hoy en día el laboratorio de micobacteriología?

1.3.1. EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE LAS MICOBACTERIAS

Las técnicas de diagnóstico de las micobacterias las podemos englobar en diferentes etapas a lo largo del siglo XX. Podemos considerar que la primera etapa va desde el comienzo de la micobacteriología hasta finales de la década de los 70, la segunda etapa desde finales de los 70 hasta mediados de los 80 y por último la tercera etapa abarca desde mediados de los 80 hasta la actualidad.

1.3.1.a. Primera etapa de las técnicas diagnósticas

La primera etapa comprende desde que R. Koch describió el bacilo tuberculoso hasta la introducción de los métodos radiométricos a finales de los años 70 del siglo pasado. Durante esta época se pusieron en marcha técnicas y métodos muy útiles para el aislamiento de las micobacterias, su identificación y el estudio de su sensibilidad a los quimioterápicos y su patogenicidad en animales. En general, estas técnicas tenían el gran inconveniente de ser técnicas lentas. Se necesitaban 1-2 meses para el aislamiento, 1-2 meses más para la identificación de las micobacterias y un mes para conocer la susceptibilidad a los fármacos.

Robert Koch en 1882 tiñó, aisló y demostró que el bacilo que lleva su nombre era la bacteria causante de la tuberculosis humana.

Löwenstein presentó un medio de cultivo para el aislamiento de *M.tuberculosis* y con la modificación subsiguiente de Jensen se dispone de un medio muy adecuado para el cultivo del bacilo de Koch. Este medio está basado en patata glicerizada y yema de huevo fresco, con la adición de verde de malaquita, como inhibidor de contaminaciones, y que le confiere su color verdoso característico. *M.tuberculosis* crece habitualmente entre los 21-40 días de la inoculación, mientras que entre las micobacterias ambientales algunas crecen rápidamente en menos de 7 días, mientras que otras especies como *M.avium* complex pueden requerir entre 40-60 para su detección.

Otro hito importante de esta primera etapa representó la tinción de Ziehl-Neelsen. Las micobacterias son ácido-alcohol resistentes y quedan teñidas de color rojo, mientras que el resto de las bacterias adquieren el color del azul de metileno.

La localización más frecuente de la tuberculosis es la forma pulmonar. Para el aislamiento de las micobacterias, a partir de muestras respiratorias u otras contaminadas con flora comensal, es necesario eliminar esta flora para permitir que crezca la micobacteria en el cultivo. Para eliminar la flora comensal se trata la muestra con álcalis o ácidos y posteriormente se neutraliza, se concentran los bacilos por centrifugación y el sedimento se utiliza para realizar una extensión para la tinción y para la inoculación en los medios de cultivo apropiados. A este proceso se le conoce con el nombre de descontaminación y concentración. Petroff propuso el tratamiento de las muestras (descontaminación) con NaOH al 4%. Es un método muy agresivo también para las micobacterias. Se han descrito otros métodos más suaves para no matar tantas micobacterias como en el método de Petroff. En Europa, clásicamente, se había utilizado el método de Tacquet-Tison³⁰, consistente en tratar las muestras con sosa al 1% y

homogeneizarlas con lauril sulfato de sosa para posteriormente neutralizarlas con ácido orto-fosfórico y concentrarlas. En Estados Unidos el método más ampliamente utilizado es el descrito por Kubica-Krasnow en el que se emplea sosa al 2% y N-acetil-L-cisteína como agente licuante, para posteriormente neutralizarlas con tampón fosfato pH 6,8 y concentrarlas por centrifugación.

Las diferentes especies de micobacterias se identificaban por características morfológicas de las colonias y por pruebas fisiológicas y bioquímicas. Entre las pruebas fisiológicas podemos contar la velocidad de crecimiento en medio sólido y su respuesta a la fotoinducción. Se han empleado también numerosas pruebas bioquímicas. La producción de niacina, la presencia de nitrato reductasa, la termorresistencia a 68°C de la catalasa, la sensibilidad a la pirazinamida, al ácido tiofeno 2-carboxílico y a la cicloserina permiten diferenciar entre las especies del complejo de *M.tuberculosis* (*M.tuberculosis*, *M.bovis* y *M.bovis*-BCG). Por el contrario, la identificación bioquímica de las micobacterias ambientales es difícil, lenta, requiere numerosas pruebas diferentes y los resultados no siempre son reproducibles^{31,32}. Entre las pruebas necesarias se incluyen, además de las ya citadas, la catalasa semicuantitativa, el crecimiento en medio con 5% de NaCl, la reducción del telurito, la hidrólisis de la urea y la hidrólisis del Tween 80³³.

A esta primera etapa pertenece también el método de las proporciones de Canetti, Rist y Grosset², para conocer la sensibilidad de las micobacterias a los quimioterápicos de primera (isoniazida, rifampicina, estreptomina, etambutol y pirazinamida) y de segunda línea (capreomicina, etionamida, ácido para-amino-salicílico (PAS), etc.). Se basa en comparar el número de colonias crecidas en un medio con el fármaco a la concentración crítica con las crecidas en un tubo con medio sin el fármaco antituberculoso. Los tubos inoculados se leen a las 21 y 30 días y se calcula el porcentaje de colonias crecidas los tubos con fármaco. Si para algún fármaco determinado, el porcentaje es superior al 1% se considera que la micobacteria es resistente a dicho fármaco.

1.3.1.b. Segunda etapa

Comienza a mediados de la década de 1970. Se caracteriza por la introducción de métodos de cultivo y de antibiograma más rápidos, que se basan en el empleo de sistemas radiométricos de detección del crecimiento. Nos referimos al sistema radiométrico BACTEC[®], Becton Dickinson Mycobiology Systems, USA. La limitación más importante del sistema consiste en la necesidad de emplear material radiactivo: muchos laboratorios no obtienen las licencias necesarias y es problema asimismo la eliminación de los residuos radiactivos. Este sistema se basa en el empleo de frascos con medio base de caldo 7H9 de Middlebrook enriquecido, donde el ácido palmítico se halla marcado con carbono-14. Durante el crecimiento de la micobacteria se desdobra el ácido palmítico y el CO₂ liberado tiene carbono-14. La radiactividad del gas se detecta en un contador beta, que dispone el equipo BACTEC 460 TB, y la cantidad de radiactividad está directamente relacionada con la cantidad de micobacteria que crece en el medio de cultivo. Este sistema ofrece una alta sensibilidad en el aislamiento de micobacterias, sobre todo de micobacterias ambientales, y sobre todo ofrece la ventaja de que las micobacterias se recuperan a los 5-10 días, entre una y dos semanas antes que en los medios sólidos de Löwenstein-Jensen³⁴.

Este mismo sistema BACTEC es actualmente el de referencia para el estudio de la sensibilidad de *M.tuberculosis* complex a los quimioterápicos de primera línea (isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomina y pirazinamida). Es una técnica muy reproducible, fácil de realizar, y como gran ventaja ofrece la rapidez en conocer el resultado, entre 4 y 10 días, en vez del mes requerido en el método de las proporciones en Löwenstein-Jensen^{34,35}.

A esta etapa pertenece también el empleo de agar Middlebrook 7H10 y 7H11, medios transparentes que facilitan la observación de las microcolonias de las micobacterias y por lo tanto su detección precoz.

1.3.1. c. Tercera etapa

Podemos considerar que comenzó a mediados de los años 80 y que abarca hasta la actualidad. La aparición del sida y el aumento de micobacteriosis (*M.tuberculosis* y *M.avium* complex) en esos años en los países occidentales avivó el interés por las micobacterias. Fue obvia la necesidad de sistemas de detección, identificación y de sensibilidad de las micobacterias más precoces que las que se disponían. El interés de las compañías llevó a una eclosión y desarrollo de nuevas tecnologías. La cromatografía en capa fina y la cromatografía gas-líquida y la cromatografía de alta resolución (HPLC) nos posibilitan la identificación en pocos días y de manera relativamente sencilla de las especies de micobacterias más prevalentes^{36,37,38}. El empleo de medios líquidos, no radiométricos, con lectura automatizada, permitía una mayor rapidez de aislamiento y cultivo de las micobacterias (MB-BacT, ESP-II, MGIT). En esta etapa destaca el empleo de métodos genéticos, tanto para la detección de *M.tuberculosis* directamente de la muestra del paciente, mediante sistemas de amplificación de ácidos nucleicos (DNA o RNA) como para la identificación de las micobacterias una vez aisladas en un medio líquido o sólido. Asimismo, se están poniendo a punto sistemas genéticos para detectar resistencias a los quimioterápicos.

La situación creada por la "nueva tuberculosis,"²⁰ asociada al HIV en los países desarrollados, y el impacto de las nuevas técnicas de biología molecular han sido factores determinantes para que en las últimas décadas se hayan desarrollado más técnicas, más rápidas y sensibles que las tradicionales, que en las décadas precedentes en el diagnóstico de las micobacteriosis.

1.3.2. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE LAS MICOBACTERIAS

Las técnicas que actualmente disponemos para el diagnóstico de las micobacterias son muy numerosas y las podemos englobar en los siguientes apartados:

- a. Observación microscópica de las micobacterias tras tinciones realizadas de extensiones de las muestras clínicas
- b. Diagnóstico de las micobacterias mediante diferentes técnicas de amplificación genética de ácidos nucleicos
- c. Aislamiento de las micobacterias mediante el cultivo en medio sólido o líquido
- d. Identificación de las micobacterias aisladas.
- e. Estudio de la sensibilidad "in vitro" de *M.tuberculosis* a los quimioterápicos
- f. Estudio de la sensibilidad "in vitro" de las micobacterias ambientales a los quimioterápicos
- g. Aplicación de técnicas de biología molecular en estudios epidemiológicos de la tuberculosis

1.3.2.a. Observación microscópica de las micobacterias tras tinciones realizadas de extensiones de las muestras clínicas

Ya R. Koch en 1882 fue capaz de observar las micobacterias al microscopio óptico tras tinción. La tinción de Ziehl-Neelsen ha sido la clásica para teñir las micobacterias. Las micobacterias, por su alto contenido lipídico en su pared, son difíciles de teñir. Pero una vez teñidas las micobacterias con fucsina son difíciles de decolorar y resisten incluso la decoloración con ácido y alcohol durante 3-5 minutos, a diferencia del resto de las bacterias. Al añadir el contracolorante de azul de metileno, las demás bacterias adquieren un color azul mientras que las micobacterias permanecen de color rojo. La tinción se realiza en 5-10 minutos,

pero un buen examen requiere 5-15 minutos adicionales a 1.000 aumentos. La sensibilidad de la tinción es del 40-60% respecto al cultivo. Esta tinción sigue siendo la preferida para teñir muestras urgentes y para confirmar las muestras positivas detectadas por la tinción de auramina O. Aunque tiene una menor sensibilidad que la tinción de auramina O, en cambio proporciona información adicional sobre la morfología de la micobacteria que puede ser útil para saber la especie de micobacteria de que se trate. Así, en ocasiones, al ver un bacilo ácido-alcohol largo, ancho, atigrado podemos sugerir al clínico que se puede tratar de *M.kansasii*, para que tome en consideración la posibilidad de cambiar el tratamiento. También, en pacientes con sida, en los que se observen cocobacilos ácido-alcohol resistentes, pequeños, redondeados podemos pensar que nos encontramos ante *M.avium* complex o *M.genavense*³⁹.

Las muestras no urgentes se concentran por centrifugación, tras el proceso de descontaminación o no dependiendo de la procedencia de la muestra. Con el sedimento del centrifugado se practica una extensión en un portaobjetos y se tiñe mediante la tinción de auramina O⁴⁰. Se tiñe la extensión con colorante de auramina O, sustancia fluorescente, durante 15 minutos, se decolora con ácido-alcohol durante 3 minutos y se contracolora con permanganato potásico al 0,5%. Se observa la preparación en un microscopio fluorescente a 200- 400 aumentos durante 3-5 minutos. Las micobacterias se observan más fácilmente en la tinción de auramina que en la de Ziehl-Neelsen y en manos expertas ofrecen una mayor sensibilidad. La ventaja fundamental de la fluorescencia es la rapidez en que se realiza el examen de la extensión. Un laboratorio que tenga que procesar más de 10 muestras cada día es conveniente que utilice esta técnica de fluorescencia. Las muestras positivas con auramina O es preferible confirmarlas con la tinción de Ziehl-Neelsen. Saceanu y cols⁴¹ aplican el sistema de citocentrifugación para realizar extensiones concentradas del sedimento y en sus manos se obtienen mejores resultados que con la extensión habitual, pero el uso de citoconcentradores de un sólo uso puede resultar excesivamente caro.

Un buen examen microscópico de las muestras tiene una importancia capital en el control de la tuberculosis. Es importante detectar bien y precozmente, en menos de una hora, los pacientes bacilíferos, porque éstos son los contagiosos, con el fin de ofrecerles el tratamiento antituberculoso adecuado y romper la cadena de transmisión a otras personas. Además, tiene la ventaja de su bajo coste (0,3 Euros).

Como la eliminación del bacilo tuberculoso puede ser discontinua en el tiempo, es preferible analizar tres muestras obtenidas en días consecutivos o alternos.

En los aspirados gástricos puede encontrarse *M.gastri* como flora comensal y asimismo *M.fortuitum* o *M.smegmatis* en muestras de orina, lo cual ha de tenerse en cuenta a la hora de valorar el resultado obtenido en la tinción de dicho tipo de muestras.

1.3.2.b. Diagnóstico de las micobacterias mediante diferentes técnicas de amplificación genética de ácidos nucleicos

Desde el momento de su presentación en el año 1985 se supo que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permitía sintetizar por vía enzimática millones de copias de un fragmento específico de DNA, podía revolucionar por su rapidez y sensibilidad el mundo del diagnóstico de las enfermedades infecciosas.

Bases conceptuales

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos permiten multiplicar de manera sucesiva fragmentos específicos de DNA o RNA de *M.tuberculosis* o de otras micobacterias. Mediante un proceso enzimático se pueden obtener millones de copias de la diana escogida, facilitando de esta manera la detección de *M.tuberculosis* u de otras micobacterias. Este proceso de amplificación tanto se puede realizar directamente de la muestra clínica o de la cepa una vez aislada.

Esta tecnología, aplicada al diagnóstico de la tuberculosis, ha podido solventar, al menos en parte, algunos de los inconvenientes del diagnóstico ordinario de la tuberculosis. Ofrece un diagnóstico rápido (2-6 horas), en vez de tener que esperar el resultado del cultivo que tarda 20-40 días en medio sólido.

A finales de la década de los años 80, se publicaron los primeros artículos sobre la utilidad de la PCR en el diagnóstico de la tuberculosis. Eran trabajos preliminares, en los que se empleaban protocolos muy diversos y, en cierta forma, rudimentarios y con protocolos propios del laboratorio "home made". Los resultados obtenidos eran dispares, tanto en sensibilidad como en especificidad, ya que se basaban en diferentes sistemas de extracción de ácidos nucleicos, de cantidad de muestra a amplificar y de diversos sistemas de detección del amplificado⁴²⁻⁴⁴.

Las poderosas casas comerciales pusieron en el mercado sistemas inicialmente manuales, pero con las condiciones bien estandarizadas y por lo tanto sus productos para la amplificación permitían obtener resultados más reproducibles y comparables entre los diferentes laboratorios. Han continuado ofreciendo sistemas cada vez más rápidos y automatizados y con la posibilidad de ser implantados fácilmente en la mayoría de los laboratorios para el diagnóstico de la tuberculosis. Disponemos en el mercado de numerosos equipos que han sido ampliamente evaluados.

Todas estas técnicas de amplificación constan básicamente de tres procesos: a) preparación de la muestra, b) amplificación del ácido nucleico DNA o RNA y c) detección del producto amplificado.

a) Preparación de la muestra.

La muestra debe ser tratada para liberar el ácido nucleico de la micobacteria y poder ser amplificada en el paso posterior. El tratamiento

de la muestra, también, tiene como objeto anular las posibles sustancias inhibidoras de la amplificación. Existen numerosos procedimientos de preparación de la muestra que incluyen la lisis mecánica, mediante sonicación, la lisis por tratamiento térmico y el tratamiento químico con detergentes y proteasas. En ocasiones, antes de proceder a la amplificación, se prefiere purificar el ácido nucleico mediante columnas de intercambio iónico o mediante precipitación formol-éter-cloroformo.

b) Amplificación del ácido nucleico

El objeto de esta etapa es amplificar millones de veces el segmento de ácido nucleico. Las condiciones de amplificación y los reactivos empleados son diferentes según el sistema de amplificación adoptado.

Se puede optar por amplificar DNA o RNA. O también por amplificar un segmento específico de *M.tuberculosis* o bien un segmento común a las bacterias o micobacterias y hacer posteriormente que la detección sea específica.

c) Detección del producto amplificado

El producto amplificado se puede detectar mediante electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio, mediante hibridación en soporte sólido como en los enzimoimmunoensayos (EIA) o mediante hibridación en solución.

Equipos comercializados de amplificación génica

Los productos disponibles los podemos clasificar en aquellos que amplifican DNA y los que amplifican RNA.

Entre los productos que amplifican DNA podemos destacar a Amplicor[®] y Cobas Amplicor[®] que comercializa la casa comercial Roche Diagnostic Molecular Systems y a LCx *Mycobacterium tuberculosis* Assay de la casa Abbott Laboratorios.

La casa comercial Gen-Probe ha puesto en el mercado productos que detectan *M.tuberculosis* por amplificación de RNA, como es el Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (AMTDT-2).

Amplicor[®] Mycobacterium tuberculosis Test y Cobas Amplicor[®] Mycobacterium tuberculosis Test (Roche Diagnostic Molecular Systems)

Amplicor[®] *Mycobacterium tuberculosis* Test es un equipo manual para detectar *M.tuberculosis* directamente de la muestra original o de cultivo, mientras que el Cobas Amplicor[®] *Mycobacterium tuberculosis* Test representa su versión totalmente automatizada.

La preparación de la muestra y la extracción del DNA se realizan por lisis alcalina. La amplificación de DNA se realiza por PCR y, en concreto, se amplifica un segmento de 584 pares de bases ubicado en el gen que codifica para el ARN ribosómico 16S. El enzima de amplificación utilizado es la Taq- polimerasa. El sistema de detección se basa en el empleo de sondas específicas de especie, que una vez unidas al producto amplificado dan lugar a una reacción colorimétrica por EIA.

La versión automatiza Cobas Amplicor[®] dispone de dos importantes novedades como son el uso de un control interno de amplificación y el uso de partículas magnéticas unidas a la sonda específica para la captura de los amplicones. Las dos versiones ofrecen una ventaja adicional, como es el disponer de un sistema para impedir los falsos positivos debidos a amplicones previamente formados.

La sensibilidad ofrecida por el sistema Amplicor[®] y Cobas Amplicor[®] ha sido del 66-82% y una especificidad del 99-100% en muestras respiratorias, en comparación con los resultados obtenidos por cultivo⁴⁵. La sensibilidad ha oscilado entre el 50 y 60% en las muestras Ziehl-Neelsen negativas.

LCx Mycobacterium tuberculosis Assay (Abbott Laboratorios, Chicago, USA)

Es un sistema semiautomático que se basa en una amplificación del DNA por reacción en cadena de la ligasa (LCR). La extracción del DNA se realiza por aumento de la temperatura y lisis mecánica. Se amplifica el DNA por LCR, mediante los enzimas DNA polimerasa y DNA ligasa. El gen que se amplifica codifica para la proteína antigénica b específica del complejo *M.tuberculosis*. El amplicón se detecta por enzimo-inmunoanálisis de micropartículas (MEIA).

LCx Mycobacterium tuberculosis Assay (LCx) ha sido evaluado entre otros^{46,47} por nuestro grupo de trabajo, tanto para muestras respiratorias⁴⁸ como extrarrespiratorias⁴⁹. Los valores de sensibilidad del sistema LCx oscilan entre 53-72% en las muestras respiratorias baciloscopia-negativa y del 71-78 en las muestras extrarrespiratorias baciloscopia-negativa. La sensibilidad es superior al 98% en las muestras baciloscopia positivas.

Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test (AMTDT) (Gen-Probe Inc. USA)

La amplificación de dianas de ARN tienen la ventaja de que a) el ARN es más lábil que el DNA y por lo tanto el peligro de contaminaciones con amplicones es menor y b) hay muchas más dianas de RNA (unas 1000-2000 por cada bacteria) que la única molécula de DNA.

El equipo AMTDT amplifica rRNA 23S mediante la síntesis de DNA complementario y ARN. Se emplea transcriptasa inversa y la RNA polimerasa. Es

un proceso que ocurre a temperatura constante y de forma autocatalítica que permite amplificaciones del orden de millones de veces con una incubación a 42°C durante 2 horas. La detección de los amplicones ocurre mediante una sonda específica de *M.tuberculosis*, marcada con éster de acridina quimioluminiscente. La prueba de protección de la hibridación permite distinguir los híbridos rRNA-DNA de la sonda marcada no hibridada. La lectura de la quimioluminiscencia de los híbridos se hace mediante un luminómetro.

AMTDT es una técnica manual, sencilla, que no requiere de instrumentación importante, fácil de aplicar en cualquier laboratorio clínico y que ofrece unos resultados rápidos (en menos de 3 horas) y con una alta sensibilidad y especificidad.

En la primera versión de AMTDT (AMTDT-1) se empleaban 50 mL de muestra y en la segunda versión (AMTDT-2) se hace uso de 450 mL de muestra, lo que permite aumentar algo la sensibilidad en las muestras paucibacilares. Ambas versiones ha sido ampliamente evaluadas. En líneas generales podemos aceptar que ofrecen una sensibilidad global de 66-82% y una especificidad del 99%^{47,50-52}.

Utilidad de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos actualmente disponibles

Ya hemos indicado que la sensibilidad de los diferentes equipos de amplificación en las muestras respiratorias, que son baciloscopia-positivas, es superior al 95% y que la especificidad es superior al 99%. Debido a ello, la Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado los equipos comercializados citados para el estudio de la detección del bacilo tuberculoso en muestras respiratorias baciloscopia-positivas.

En la mayoría de los estudios, la sensibilidad que ofrecen estos equipos para las muestras baciloscopia-negativas oscila entre el 50-75%. Por lo tanto, un resultado negativo no descarta que el paciente pueda sufrir una tuberculosis. La FDA no ha aprobado los equipos de amplificación para el estudio de muestras que son baciloscopia negativa.

Si una muestra es baciloscopia-positiva y el equipo de amplificación da un resultado positivo podemos concluir que en la muestra hay bacilo tuberculoso. Si la muestra es baciloscopia-positiva y la reacción de amplificación da resultado negativo podemos concluir, con un alto margen de seguridad, que en la muestra hay una micobacteria pero que ésta es una micobacteria ambiental.

En las muestras con baciloscopia negativa sólo se debería practicar una técnica de amplificación si hubiera una sospecha elevada de que el paciente tenga una tuberculosis. Si el resultado de la amplificación fuera positivo sería deseable analizar otra muestra, antes de aseverar que el paciente tiene tuberculosis. Si tres muestras de un paciente dieran resultado negativo podríamos asegurar que la probabilidad de que el paciente tuviera tuberculosis es muy baja.

Estos equipos no están aprobados por la FDA para muestras extrarrespiratorias (líquidos cefalorraquídeos, biopsia, etc.) en las que obtener de manera urgente el diagnóstico de tuberculosis es muy importante. En los casos necesarios se puede realizar el test y valorarlo según las pautas ya indicadas y de acuerdo con el cuadro clínico del paciente⁵³.

Las técnicas de amplificación siguen siendo aún excesivamente caras (30 Euros) y no pueden ser practicadas a todas las muestras en que se solicita investigación de micobacterias. Deben realizarse cuando sean necesarios⁵³, en base a criterios sensatos y de común acuerdo entre los clínicos y los microbiólogos.

Por lo anteriormente expuesto, hace falta indicar que, para valorar adecuadamente los resultados obtenidos con las pruebas de amplificación, es totalmente necesaria la estrecha relación entre el clínico y el microbiólogo.

1.3.2.c. Aislamiento de las micobacterias mediante el cultivo en medio sólido o líquido

1.3.2.c.1 Concentración y descontaminación de las muestras.

Las muestras de los pacientes, antes de ser inoculadas en los medios de cultivo, si su volumen lo permite, deben ser concentradas por centrifugación. Hay muestras que proceden de territorios que contienen bacterias comensales, como ocurre con las muestras de esputo, broncoaspirado, lavado broncoalveolar, aspirado gástrico, orina, heces, etc. El rápido crecimiento de la flora comensal impediría el desarrollo de las micobacterias en los medios de cultivo, por lo que es preciso aplicar técnicas de descontaminación de la flora y de homogeneización de las muestras. Estas técnicas, generalmente, se basan en el uso combinado de un agente homogeneizante mucolítico y una base o un ácido fuerte, una neutralización posterior y finalmente una concentración de las micobacterias por centrifugación. Este concentrado final puede ser utilizado para la práctica de extensiones que serán teñidas por Ziehl-Neelsen o auramina O, para el cultivo en medio sólido y líquido y para las técnicas de amplificación genética.

El elevado contenido lipídico de la pared de las micobacterias le hace más resistente que otras bacterias al proceso de descontaminación. El rendimiento final de los cultivos está muy condicionado por la eficacia de este proceso previo. Una descontaminación demasiado enérgica o prolongada puede ser lesiva para las micobacterias impidiendo su crecimiento en cultivo. Por el contrario, una descontaminación poco eficaz dará lugar a un número excesivo de contaminaciones de los cultivos.

El sistema de descontaminación de Tacquet-Tison³⁰ es adecuado para las muestras que vayan a cultivarse en medio con huevo, como ocurre en el medio de Löwenstein-Jensen. Es una técnica que permite conseguir una buena sensibilidad del cultivo y logra un porcentaje de contaminación del cultivo inferior al 5%. En cambio, se sabe que el laurilsulfato de sodio residual del sedimento puede impedir el crecimiento de las micobacterias en medio líquido, como es el sistema radiométrico BACTEC. Asimismo, pudimos demostrar que el laurilsulfato residual puede inhibir las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, por lo que recomendábamos un lavado adicional con agua destilada o tampón fosfato si el sedimento lo pensábamos utilizar para dichas técnicas de amplificación⁵⁴.

El sistema de descontaminación de Kubica, con la modificación de Krasnow, logra buenas sensibilidades en el aislamiento de las micobacterias. El sedimento obtenido puede ser empleado para el cultivo en medio de Löwenstein-Jensen, pero también en medios sólidos con base de agar como el agar Middlebrook 7H10 y 7H11 y en medios líquidos como en el sistema BACTEC. Otra ventaja adicional, respecto al método de Tacquet-Tison, es que el sedimento no requiere de un lavado adicional si se quiere emplear para técnicas de amplificación genética. Un pequeño inconveniente es el mayor porcentaje de contaminaciones en medio sólido que en el método de Tacquet-Tison. Hoy en día, es el método más ampliamente empleado en el mundo.

1.3.2.c.2. Medios de cultivo de micobacterias

Los medios de cultivo habituales los podemos clasificar en medios sólidos, medios líquidos, medios bifásicos y medios especiales para aislamiento de micobacterias en sangre (hemocultivos). La utilización de un medio sólido en combinación con un medio líquido se considera actualmente lo más idóneo, por que proporciona la mayor sensibilidad y rapidez para el cultivo de micobacterias.

La mayoría de las micobacterias crecen en 2-5 semanas en los medios sólidos y en 1-3 semanas en los medios líquidos.

En condiciones habituales los cultivos inoculados deben incubarse a 35-37°C durante 42-60 días, preferiblemente en ambiente aerobio, preferiblemente enriquecido con 5% de CO₂. *M.haemophilum*, *M.genavense*, *M.ulcerans*, *M.marinum*, *M.conspicuum*, *M.avium* subs. *paratuberculosis* requieren medios y condiciones de cultivo especiales. *M.haemophilum* requiere la adición de hemina o citrato amónico férrico al medio de cultivo. *M.genavense* crece de manera muy lenta y su crecimiento sólo se detecta a los 2-6 meses de incubación en los viales de BACTEC 12B o BACTEC 13A a pH ácido. Las micobacterias causantes de infecciones cutáneas o de tejidos blandos son habitualmente *M.ulcerans*, causante de la úlcera de Buruli en África, *M.marinum* que es el causante del granuloma de las piscinas o acuarios, *M.haemophilum* causante de infección diseminada en pacientes inmunodeprimidos y las micobacterias de crecimiento rápido entre las que se incluyen *M.fortuitum* complex, *M.chelonae*, *M.abscessus* y *M.mucogenicum*. Este tipo de muestras debe cultivarse a 35-37°C y a 28-32°C, porque en ocasiones estas micobacterias crecen exclusivamente a esta última temperatura, especialmente en el cultivo primario.

Los medios sólidos han sido los más utilizados en la micobacteriología clásica. Los medios sólidos, a diferencia de los líquidos, permiten observar la morfología colonial de las micobacterias aisladas. Pueden tener como base huevo coagulado y patata como ocurre en el medio clásico de Löwenstein-Jensen y en el medio de Coletsos, éste último enriquecido con oligoelementos. En el medio de Löwenstein-Jensen crecen bien *M.tuberculosis* y *M.bovis*-BCG del complejo tuberculoso, pero con dificultad *M.bovis*. Esta última especie y las cepas de *M.tuberculosis* con alta resistencia a la isoniazida crecen mejor en el medio de Coletsos y en el medio de Löwenstein-Jensen enriquecido con piruvato. Habitualmente crecen a los 20-30 días a 37°C en ambiente aerobio. Algunas especies de micobacterias crecen perfectamente en estos medios, aunque

M. avium complex crece lentamente y es frecuente no detectar su crecimiento hasta los 40 días de incubación.

Middlebrook y Cohn describieron medios sólidos semisintéticos. El medio de Middlebrook 7H10 es (7H10) un medio transparente con agar, basado en el caldo 7H9 de Middlebrook, enriquecido y suplementado con OADC (oleico, albúmina, dextrosa y catalasa). El medio de Middlebrook 7H11 (7H11) tiene la misma composición del 7H10 con la adición de hidrolizado de caseína para facilitar el aislamiento de cepas de *M. tuberculosis* con alta resistencia a la isoniazida. Son medios de uso frecuente en Norteamérica. Estos medios deben ser incubados en ambiente con 5-10% de CO₂ durante un mínimo de 42 días. Permiten el examen de las placas de medio al microscopio a bajo aumento y por lo tanto el cultivo de las micobacterias puede ser detectado precozmente en forma de microcolonias, en general una semana antes que en el medio de Löwenstein. Esta rápida detección del cultivo también la hemos encontrado en uno de los artículos de la presente tesis. El inconveniente de las placas de 7H10 y 7H11 respecto a los tubos con medio de Löwenstein reside en la mayor probabilidad de contaminación del medio de cultivo, la tendencia a la deshidratación de las mismas con la incubación prolongada y la mayor probabilidad de contagio del laborante.

El gran inconveniente de los medios sólidos es que para obtener el aislamiento se tenga que esperar entre 15 y 40 días. Para obviar este inconveniente se han ido desarrollando diferentes sistemas de cultivo líquidos.

Los sistemas de cultivo en medio líquido ofrecen la ventaja fundamental de la rapidez en la detección del cultivo de las micobacterias (una o dos semanas antes que en los medios sólidos), así como una mayor sensibilidad en el aislamiento de las micobacterias, fundamentalmente de las micobacterias ambientales. Los podemos clasificar en sistemas radiométricos y no radiométricos.

Sistema BACTEC 12B (Becton Dickinson Microbiology Systems, USA)

Este sistema se empezó a utilizar en los laboratorios clínicos a finales de los 70. Se emplea un medio de cultivo líquido semisintético 7H12 de Middlebrook (caldo base 7H9 de Middlebrook enriquecido con albúmina, catalasa e hidrolizado de caseína), una mezcla selectiva PANTA (polimixina B, azlocilina, ácido nalidíxico, trimetoprim y anfotericina B) y un suplemento de enriquecimiento de estearato de polioxietileno (POES). El medio líquido contiene sustratos marcados con carbono radiactivo, en concreto ácido palmítico marcado con C-14 radiactivo. Si en la muestra inoculada existen micobacterias, éstas utilizarán el ácido palmítico y liberarán $^{14}\text{CO}_2$ a la atmósfera del vial. Este $^{14}\text{CO}_2$ podrá ser detectado automáticamente en el aparato BACTEC 460 TB, que dispone de un contador beta de radiactividad. La cantidad de radiactividad medida es transformada mediante un electrómetro en un valor numérico en una escala de 0 a 999 y su valor será directamente proporcional al crecimiento bacteriano en el seno del medio líquido.

La sensibilidad del sistema BACTEC[®] es superior a la de los medios de cultivo tradicional, tanto para *M.tuberculosis* como especialmente para el aislamiento de micobacterias ambientales. No obstante, la ventaja más importante de este sistema es el ahorro de tiempo en el aislamiento de *M.tuberculosis* (15-20 días de promedio) en relación a los cultivos sólidos. El crecimiento de *M.tuberculosis* se detecta entre los 4 y 30 días y el de *M.avium* antes de los 15 días⁵⁵.

Se podrán identificar las especies crecidas en el medio líquido mediante sondas de DNA marcadas con ésteres de acridina (AccuProbe; Gen-Probe INC, San Diego, USA)^{39,56} y mediante sistemas de identificación por hibridación en fase sólida como en el sistema Inno-Lip A⁵⁷.

También permite realizar antibiogramas de *M.tuberculosis* a los quimioterápicos de primera línea, de manera rápida y relativamente simple, mediante una adaptación del método de las proporciones³⁵.

Un inconveniente del sistema es la necesidad de emplear agujas para aspirar el $^{14}\text{CO}_2$, que si son esterilizadas deficientemente, pueden dar lugar a resultados falsos de cultivo por contaminación entre los diferentes frascos de cultivo, como observaron Vannier y cols⁵⁸.

El principal inconveniente del sistema BACTEC reside en la necesidad de trabajar con carbono radiactivo. Esto exige disponer de las autorizaciones y licencias oportunas del Consejo de Energía Nuclear para poder almacenar y manipular estas sustancias, personal con licencia de Supervisor de instalación radiactiva y acuerdo con ENRESA para que elimine los residuos radiactivos producidos. Éste ha sido el motivo principal por el que, a pesar de las indudables ventajas que comporta su utilización, muchos laboratorios clínicos no hayan incorporado el sistema y que, actualmente, los laboratorios opten por sistemas de cultivo líquidos no radiométricos.

Sistemas rápidos de cultivo en medio líquido no radiométricos

En la última década se han ido introduciendo en el mercado nuevos sistemas de cultivo, con los que se pretende alcanzar una sensibilidad y rapidez de detección similar al sistema BACTEC[®] sin necesidad de usar sustancias radiactivas. Tienen la ventaja adicional sobre el sistema BACTEC[®], de que la lectura está totalmente automatizada y que por lo tanto su uso es mucho menos laborioso para el personal. Por lo que, cada vez más, están sustituyendo al sistema radiométrico.

Una vez detectado el crecimiento de las micobacterias, éstas pueden ser identificadas directamente del medio líquido mediante sondas AccuProbe o

técnicas de hibridación en fase sólida, como ha sido comentado en el apartado del sistema BACTEC®^{39,56,57}.

Mycobacteria Growth Indicator Tubes System® (MGIT) (Becton Dickinson Microbiology Systems, USA)

Los tubos contienen un medio de cultivo semisintético, de composición similar al del BACTEC® con medio líquido de 7H9 de Middlebrook, con un suplemento de enriquecimiento de F (ácido láctico, albúmina bovina, glucosa y biotina) y la mezcla selectiva PANTA. Además, llevan incorporado un compuesto de rutenio que emite fluorescencia a medida que disminuye la tensión parcial de O₂ del medio como consecuencia del crecimiento bacteriano. La detección de la fluorescencia se realiza exponiendo los tubos de cultivo a una luz ultravioleta. Si no apreciamos fluorescencia, indica que no hay crecimiento bacteriano y si en tubo han crecido micobacterianas observamos una fluorescencia amarillo-naranja en la superficie y en el fondo del tubo. Actualmente, este proceso está automatizado y los tubos se introducen en un instrumento que es a la vez un incubador y lector de la fluorescencia de los tubos MGIT (BACTEC MGIT 960 System de Becton-Dickinson Microbiology Systems, USA). El instrumento monitoriza el nivel de fluorescencia cada 10 minutos y detecta el crecimiento micobacteriano.

Este sistema MGIT ofrece una rapidez de detección similar al sistema radiométrico. La media del tiempo necesario para la detección del crecimiento bacteriano es de 10 días para *M.tuberculosis* y de 12 días para las micobacterias ambientales. La sensibilidad para aislar micobacterias es un poco inferior al del sistema BACTEC®, tanto para *M.tuberculosis* como para las micobacterias ambientales⁵⁹, aunque algunos consideran que son de eficacia equivalente^{60,61}.

ESP Cultura System II-Myco (AccuMed Internacional INC, USA)

Es sistema ESP Culture System II-Myco (ESP II) es otro sistema líquido no radiométrico con lectura automatizada del crecimiento micobacteriano. Se utilizan frascos con medio líquido similar al del BACTEC 12B, y con unas pequeñas esponjas en el interior del frasco con el propósito de facilitar el crecimiento micobacteriano. A los frascos inoculados se les coloca un conector, que contiene un filtro con el que se mide la presión en el interior del frasco. El crecimiento micobacteriano consume el oxígeno del interior del frasco y por lo tanto se reduce la presión en el interior del mismo, lo cual es detectado por el filtro que se halla en el conector y el instrumento indica que el cultivo es positivo. En general, la positividad se objetiva 5-10 días más tarde que en el sistema radiométrico, y 5-10 antes que en los medios sólidos convencionales. También la sensibilidad es algo inferior al sistema radiométrico, pero mayor que en los medios sólidos⁶².

MB-BacT Mycobacteria Detection System (MB-BacT)

Aunque hasta fecha reciente el sistema estaba distribuido por Organon Teknika Corporation, Holanda; actualmente lo es por la casa comercial BioMérieux.

En el sistema MB-BacT se usan frascos de 10 mL con medio líquido similar al de los frascos del BACTEC 12B. Al suplemento selectivo se le ha incorporado vancomicina recientemente. Un sensor en la base de cada botella detecta el CO₂, presente en el interior de frasco, que es producido durante el crecimiento bacteriano. Esta acidificación del medio hace cambiar el color del sensor, y el instrumento indica el frasco positivo. En general, la positividad del cultivo ocurre unos 3-7 días más tarde que en el sistema radiométrico, algún día antes que en el sistema ESP II, y unos 7-13 días antes que en el medio de Löwenstein-Jensen. *M.xenopi* crece lentamente y solamente es detectado por el MB-BacT en la mitad de las ocasiones⁶³.

MB-BacT es un sistema seguro y robusto para el cultivo micobacteriano. No está autorizado por la FDA., a fecha de 2003, para la realización de los

antibiogramas de *M.tuberculosis* a los quimioterápicos y ello supone actualmente su mayor inconveniente.

MB-Check o Septi-Check AFB

Es un sistema bifásico comercializado diseñado por la casa comercial Roche. Actualmente la distribuye la empresa Becton-Dickinson Microbiology Systems, aunque ha dejado de promocionarla, ya que dispone de otros productos en el mercado (BACTEC y MGIT).

El sistema está compuesto de un frasco con 20 mL de caldo 7H9, enriquecido con glicerol, catalasa, albúmina y suplemento PANTA y una atmósfera de 20-40% de CO₂. Se inocula el frasco con la muestra y se enrosca en la parte superior del frasco un dispositivo que contiene medio de agar Löwenstein-Jensen, agar 7H11 y agar chocolate, éste último para apreciar las contaminaciones bacterianas o fúngicas. Una vez inoculado, y enroscado, se agita el frasco y se incuba a 35-37°C durante dos meses. Cada semana se examina el frasco y se invierte para subcultivar el posible crecimiento en medio líquido, hasta que se aprecie un cultivo positivo en el caldo o en los medios sólidos. *M.tuberculosis* crece como una película en la superficie del medio líquido y como grumos en el fondo del medio líquido. Otras micobacterias dan lugar a un crecimiento turbio uniforme. La sensibilidad del MB-Check puede ser incluso superior al BACTEC 12B, ya que se puede inocular más volumen de muestra. Se logran también más aislamientos que en medio de Löwenstein, sobre todo de micobacterias ambientales⁶⁴. No se puede usar para la práctica del antibiograma de *M.tuberculosis*.

Es, por lo tanto, muy útil para pequeños laboratorios, para los que sea muy gravoso el empleo de sistemas automatizados.

Hoy en día no es infrecuente que el clínico solicite el aislamiento de micobacterias en sangre. Hemos de tener en cuenta que muchos pacientes con el HIV y pacientes inmunocomprometidos pueden desarrollar infecciones diseminadas por *M.tuberculosis* cuando el paciente tiene unos 200 CD₄/mCL o por *M.avium* complex y *M.genavense* cuando su deterioro inmunológico es más severo (menos de 50 CD₄/mCL).

Entre los sistemas para aislar micobacterias de la sangre (hemocultivos) podemos señalar al sistema de lisis-centrifugación, al sistema radiométrico BACTEC 7H13A, y a los sistemas automatizados MB-BacT y MGIT.

Sistema de lisis-centrifugación Isolator 10 (Wampole Laboratorios, USA).

El tubo de Isolator 10 es un tubo con saponina y anticoagulante de polianetol-sulfonato sódico (SPS). Se introducen 5 mL de sangre del paciente y la saponina presente lisa los hematíes y los leucocitos, permitiendo que se liberen los bacilos intracelulares. Posteriormente el tubo se centrifuga y se decanta el sobrenadante. Con el sedimento se puede hacer una extensión para tinción de Ziehl-Neelsen o auramina O e inocularlos medios sólidos y líquidos deseados. En los medios sólidos se pueden contar las micobacterias presentes, y conocer el grado de micobacteriemia. Ello nos puede permitir seguir la evolución del tratamiento instaurado. Los inconvenientes del sistema son la posibilidad de contaminaciones del medio de cultivo, la manipulación de muestras de pacientes con HIV y por tanto la posibilidad de contagio del personal del laboratorio⁶⁵. Wasilaukas y cols.⁶⁶ describieron que la saponina presente en el tubo puede causar cierta inhibición en el crecimiento de *M.avium-M.intracellulare* si el sedimento se inocula en frascos de BACTEC 12B.

Sistema BACTEC 13A (Becton Dickinson Microbiology Systems, USA)

El fundamento de este sistema radiométrico es el mismo al ya indicado para el cultivo ordinario con BACTEC 12B. En este caso el frasco contiene 20 mL de caldo Middlebrook 7H12, con un medio de enriquecimiento OAC (ácido oleico, albúmina y catalasa) y un anticoagulante, para que no se coagule la sangre inoculada. Se inoculan 5 mL de sangre del paciente, se incuba a 35-37° C y el crecimiento se detecta en el contador BACTEC 460 TB por la presencia de CO₂ radiactivo.

Es el mejor método que disponemos actualmente por su mayor sensibilidad y rapidez de detección. Es capaz de indicar el crecimiento de *M.avium* complex en menos de 7 días, y de *M.tuberculosis* al cabo de 20-30 días, ya que en general la micobacteriemia es baja en esta última especie⁶⁵.

Este sistema se irá abandonado con la introducción de nuevos métodos líquidos, automáticos, debido a los residuos radiactivos a que da lugar y a que genera más trabajo para el personal.

Sistemas MB-BacT y MGIT para hemocultivos

Los sistemas MB-BacT y MGIT, ya explicados, disponen también de tubos especiales para el cultivo de micobacterias en sangre. El frasco para hemocultivo del MB-BacT contiene 50 mL de medio líquido, con anticoagulante y con medio de enriquecimiento pero sin suplemento selectivo, y puede ser inoculado con 5-10 mL de sangre del paciente.

Aunque se dispone de poca experiencia, es probable que sean inferiores al sistema BACTEC 13A, pero acabarán imponiéndose por su comodidad de uso.

1.3.2.d. Identificación de las micobacterias aisladas

En el momento presente hay unas cien especies de micobacterias caracterizadas. Las micobacterias, una vez aisladas por cultivo en medio sólido o líquido, deben ser identificadas a nivel de especie. La identificación puede abordarse con sistemáticas diferentes: a) identificación clásica convencional b) identificación cromatográfica c) identificación genotípica. En general, y desde un punto de vista práctico, se combinan diversos métodos en aras de que la identificación sea lo más rápida, cómoda y barata posible.

1.3.2.d.1. Identificación clásica convencional.

La identificación clásica se basa en la morfología peculiar de las colonias y en las características fisiológicas y bioquímicas de las diferentes especies de micobacterias. Las colonias de *M.tuberculosis* y *M.bovis* BCG son eugónicas (rugosas), mientras que las colonias de la mayoría de micobacterias ambientales tienden a ser disgónicas (lisas). Dentro de las características fisiológicas son importantes a tener en cuenta la velocidad de crecimiento (crecimiento antes o después de los 7 días) y la reacción a la fotoinducción (fotocromógenas, escotocromógenas o no cromógenas). La producción de niacina, la presencia de nitrato reductasa, la termorresistencia a 68°C de la catalasa, la sensibilidad a la pirazinamida, al ácido tiofeno 2-carboxílico y a la cicloserina permiten diferenciar entre las especies del complejo de *M.tuberculosis* (*M.tuberculosis*, *M.bovis* y *M.bovis*-BCG). Por el contrario, la identificación bioquímica de las micobacterias ambientales es engorrosa, difícil, lenta, requiere numerosas pruebas diferentes y los resultados no siempre son reproducibles^{31,32}. Entre las pruebas necesarias se incluyen, además de las ya citadas, la catalasa semicuantitativa, el crecimiento en medio con 5% de NaCl, la reducción del telurito, la hidrólisis de la urea, la hidrólisis del Tween 80 a los 5 días, la captación de hierro, la arilsulfatasa a los 3 días, el crecimiento en agar MacConkey sin cristal violeta, y la pirazinamidasa³³. Por razón de su dificultad, la identificación bioquímica de las micobacterias ambientales está sólo al alcance de laboratorios de referencia.

1.3.2.d.2 Identificación cromatográfica.

En la década de los años 70 se fueron desarrollando unas técnicas cromatográficas para la identificación de micobacterias. La pared de las micobacterias tiene un alto contenido en lípidos complejos (ceras, ácidos micólicos, ácidos grasos de cadena larga, glucolípidos, etc.). El contenido lipídico de la pared es un carácter estable y específico para cada especie de micobacteria. Ello permite la utilización de técnicas de cromatografía en capa fina (CCF) para el estudio del perfil de ácidos micólicos^{36,68}, o de cromatografía gas-líquido (CGL) para el estudio de ácidos grasos constitutivos, alcoholes secundarios y productos de pirólisis de los ácidos micólicos^{37,69}, para la identificación de las micobacterias. Se han presentado esquemas de identificación con la combinación de pruebas cromatográficas CCF y CGL³⁷ o de pruebas bioquímicas y cromatográficas⁷⁰. El empleo de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los lípidos de pared, previamente derivatizados, es una forma rápida, cómoda y reproducible de identificación³⁸. La utilización de programas adecuados, hoy en día disponibles en el mercado, asociados al HPLC facilitan la identificación reproducible de prácticamente todas las especies. Los métodos cromatográficos son rápidos, proporcionan la identificación en 24-48 horas y son relativamente baratos, pero se necesita una infraestructura inicial costosa y un equipo humano preparado y con experiencia.

1.3.2.d.3. Identificación genotípica

El amplio desarrollo de la biología molecular ha permitido conocer las secuencias de DNA o RNA específicas de cada especie micobacteriana. Disponemos de métodos diversos para conocer la región específica de la micobacteria a identificar y por lo tanto para identificarla a nivel de especie.

La identificación por técnicas de biología molecular es ya hoy la mejor alternativa para lograr una identificación correcta y rápida. Con estas técnicas

podemos identificar todas las especies a nivel molecular, encontrar nuevas especies o subespecies, identificar especies de difícil crecimiento, como *M.genavense* y reducir el peligro potencial de trabajar con micobacterias patógenas.

Entre estas técnicas podemos incluir las sondas de ácidos nucleicos y la amplificación de segmentos específicos, con caracterización del amplificado por el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción, por secuenciación o por hibridación en fase sólida.

Sondas de ácidos nucleicos. AccuProbe®. Gen-Probe, Inc, USA

Las sondas de ácidos nucleicos son fragmentos de ácidos nucleicos, complementarios a secuencias específicas de las diferentes especies, marcados con isótopos radiactivos o sustancias cromógenas.

Hace una década se comercializaron sondas de DNA (AccuProbe®, Gen Probe Inc, USA) no radiactivas, que permiten identificar especies por hibridación con el RNA ribosómico micobacteriano, en menos de 3 horas, y de manera específica a *M.tuberculosis* complex, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.kansasii* y *M.gordoniae*. Tras lisar la micobacteria a identificar, la podemos enfrentar a estas sondas y aquella sonda con la que hibride nos indicará la micobacteria de que se trata. El límite de detección de las sondas AccuProbe® es de aproximadamente 10^6 CFU/mL⁵⁶. Es una forma sencilla, específica y rápida, aunque cara, de identificar estas pocas especies de micobacterias^{39,71}.

Amplificación de ácidos nucleicos

Las técnicas de amplificación multiplican por millones de veces los fragmentos escogidos de DNA o RNA. Las técnicas de amplificación se basan en elegir un fragmento diana a amplificar y sus cebadores o iniciadores apropiados, en

preparar la muestra, en amplificarla por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y en analizar el amplificado obtenido.

Podemos identificar una especie amplificando el segmento específico, con el uso de cebadores apropiados, y detectando después el fragmento amplificado por electroforesis y tinción con bromuro de etidio.

También podemos amplificar un fragmento de DNA común a todas las especies de micobacterias y reconocer posteriormente el amplificado con sondas comerciales como son Amplicor[®] *M.tuberculosis*, Amplicor[®] *M.avium* y Amplicor[®] *M.intracellulare* de la casa comercial Roche Diagnostic System, USA.

Una tercera aproximación para identificar una micobacteria es realizar una amplificación por PCR del gen *hsp65*, común a todas las especies de micobacterias y posteriormente someter el amplificado a una lisis con los enzimas de restricción (*BstEII* y *HaeIII*) y visualizar los fragmentos de restricción en gel de agarosa tras teñir con bromuro de etidio. Este método, descrito por Telenti y cols⁷², conocido como reacción en cadena de la polimerasa y análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PRA o PCR-RFLP) es de gran utilidad en la identificación rápida de las especies micobacterianas. El polimorfismo de las diferentes especies estudiadas se puede consultar en la página www.hospvd.ch/prasite/.

La mejor herramienta actual para identificar las diferentes especies de micobacterias es, sin duda, la secuenciación de productos amplificados de las regiones hipervariables de la molécula 16S rRNA. Los amplificados se secuencian y se compara el patrón obtenido con los patrones de referencia presentes en la base de genes GenBank. Con esta metodología se han podido trabajar de manera rutinaria en diferentes laboratorios e identificar y describir nuevas especies del género *Mycobacterium*⁷³. Es un procedimiento caro y laborioso, apto para laboratorios de referencia. Sin embargo, es muy probable

que en poco tiempo se pueda realizar de manera automática con programas adecuados.

Una manera muy cómoda y sencilla de abordar la identificación de micobacterias consiste en amplificar segmentos de DNA comunes a las micobacterias y posteriormente detectar el amplificado por hibridación en fase sólida. Hay en la actualidad dos productos comercializados, que constan de tiras de nitrocelulosa donde están fijadas sondas específicas de las micobacterias más frecuentemente aisladas en la micobacteriología clínica. El sistema INNO-LIP A-II[®] Mycobacteria (Innogenetics NV, Gante, Bélgica) tiene fijadas en su tira las sondas específicas frente a *M.tuberculosis* complex, 5 genotipos de *M.kansasii*, *M.simiae*, *M.marinum/M.ulcerans*, *M.xenopi*, *M.gordonae*, *M.scrofulaceum*, *M.celatum*, *M.malmoense*, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.haemophilum*, *M.fortuitum*, *M.smegmatis* y *M.chelonae* complex. El sistema GenoType[®] Mykobakterien (Hain Diagnostika, Nehren, Alemania) incluye sondas de las mismas especies y de *M.peregrinum* y *M.phlei*. En estudios de nuestro grupo de trabajo, hemos podido constatar que el sistema INNO-LiP A[®] funciona de manera excelente⁵⁷. Tiene una muy buena sensibilidad para identificar las micobacterias crecidas tanto en medios de cultivo sólidos como líquidos, pudiéndose obtener el resultado el mismo día de trabajo (unas 6-8 horas). Con una sola tira se pueden identificar muchas especies de micobacterias e incluso coinfecciones por diversas especies en una misma muestra. Una gran ventaja de este sistema es la posibilidad real de amplificar directamente las muestras clínicas con baciloscopia positiva y posteriormente identificar la especie amplificada por hibridación con las tiras disponibles. Ello permite identificar de manera urgente la micobacteria observada en una baciloscopia positiva. Un inconveniente importante es el elevado precio de ambos equipos (30 Euros).

Las técnicas de PCR en tiempo real podrán a corto plazo utilizarse para identificar especies de micobacterias cultivadas, así como para detectarlas directamente de muestra directa.

En resumen, para identificar las micobacterias aisladas disponemos de numerosos métodos y técnicas. Cada laboratorio deberá escoger entre las diferentes opciones disponibles de una manera práctica y barata y en su caso remitir las cepas no identificadas a los laboratorios de referencia.

1.3.2.e. Estudio de la sensibilidad "in vitro" de *M.tuberculosis* a los quimioterápicos

Los fármacos de primera línea en el tratamiento de la tuberculosis son la isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomina. Como regla general, el tratamiento actual consiste en la administración de isoniazida y rifampicina durante 6 meses y de pirazinamida durante los dos primeros meses de tratamiento. Se prefiere añadir un cuarto fármaco (etambutol o estreptomina) durante los dos primeros meses en pacientes infectados por el HIV o en zonas donde la resistencia primaria a la isoniazida sea superior al 4%.

La resistencia primaria a los fármacos de primera línea en España es inferior al 8%, y destacan la resistencia a la isoniazida 3-4% y a la estreptomina 1-3%, siendo la resistencia primaria a rifampicina, etambutol y pirazinamida de inferior al 1%⁶. Con este nivel de resistencia, los pacientes que toman el tratamiento correctamente curan de su tuberculosis, siendo el índice de fracasos terapéuticos inferior al 5%.

Como ya he indicado previamente, en la última década se han notificado altos porcentajes de resistencia a estos fármacos en algunos países en vías de desarrollo y se han descrito brotes de tuberculosis multirresistente en numerosos países¹⁰. Hoy en día, parece adecuado realizar estudios de sensibilidad "in vitro" en los países con resistencia primaria a la isoniazida superior al 4% y ante toda sospecha de resistencia por fracaso terapéutico, o ante un caso de tuberculosis en un paciente que haya recibido quimioprofilaxis o que se haya infectado de un paciente con una cepa resistente o ante un

paciente procedente de países con alta resistencia. Tenover y cols²⁴ recomiendan estudiar la sensibilidad del primer aislamiento de cada paciente, y repetir el antibiograma si el cultivo de las muestras del paciente tratado correctamente continúa siendo positivo a los tres meses de tratamiento.

El estudio de la sensibilidad a los quimioterápicos se realizaba clásicamente según el método de las proporciones de Canetti y cols². En Estados Unidos adaptaron este método de las proporciones a medio sólido semisintético de Middlebrook 7H10. En la década de los 70 se adaptó el método de las proporciones al sistema BACTEC 12B radiométrico. Los nuevos equipos de cultivo líquido automatizado (ESP-II, MB-BacT, etc.) han de demostrar todavía que pueden ser adecuados para los estudios de sensibilidad. El sistema MGIT ha sido ya aprobado por la FDA estadounidense. El estudio de las mutaciones, responsables de la resistencia, mediante técnicas de biología molecular, puede permitir conocer rápidamente si una cepa es resistente.

Una técnica adecuada para el estudio de las resistencias debe tener las siguientes características: sencillez de realización, rapidez, excelente sensibilidad en la detección de resistencias y reproducibilidad.

El estudio de la sensibilidad puede realizarse mediante técnicas fenotípicas o genotípicas^{74,75}.

Estudio de la sensibilidad mediante técnicas fenotípicas

El estudio de las resistencias en *M.tuberculosis* por técnicas fenotípicas puede realizarse en medios de cultivo sólidos o líquidos. Entre los métodos en medio sólido podemos reseñar el método de las proporciones en medio de Löwenstein-Jensen de Canetti y cols², su adaptación en medio de 7H10 de Middlebrook o el sistema E-Test. Entre los sistemas líquidos destaca el sistema BACTEC[®], aunque otros medios líquidos automatizados intentan poner a punto su propio sistema (MGIT, MB-BacT, ESP II, etc.). Las grandes ventajas que ofrecen los sistemas

líquidos son la rapidez en que se puede conocer la sensibilidad de las cepas (4-14 días) y que su manipulación es muy sencilla y cómoda, a diferencia de los que sucede con el método de las proporciones en medio sólido.

Método de las proporciones en medio de Löwenstein-Jensen.

Es el método clásico de Canetti y cols.². Se utilizan tubos de Löwenstein-Jensen con quimioterápicos incorporados al medio a la concentración crítica y otros tubos de control sin fármaco. En la técnica indirecta, a partir de cepa aislada, se siembran tres diluciones (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}) de una suspensión madre conteniendo 1 mg/mL de la cepa de *M.tuberculosis* a estudio, con el fin de obtener al menos en una de las diluciones un número contable de colonias. Los tubos inoculados se incuban a 35-37° C durante 3-4 semanas y se cuenta el número de colonias en cada tubo. Si la proporción de las colonias que crecen en el tubo con fármaco es superior a la proporción crítica (generalmente el 1%) en relación con las colonias que crecen en el tubo control sin fármaco, se considera que la cepa es resistente a dicho fármaco. Los inconvenientes de este método son la lentitud en ofrecer el resultado (1 mes) y el gran trabajo necesario. El estudio de la susceptibilidad a los fármacos se puede realizar directamente de la muestra clínica si ésta contiene numerosos bacilos en la baciloscopia.

Estudio de la sensibilidad en medio de 7H10 o 7H11 de Middlebrook

Es una adaptación del método descrito por Canetti y cols². En lugar de tubos con medio de Löwenstein-Jensen se emplean placas, divididas en cuadrantes, con los medios semisintéticos de Middlebrook indicados. Tres cuadrantes de cada placa contienen el medio de cultivo con los fármacos a la concentración crítica adecuada y en el cuadrante restante hay agar sin fármaco y servirá como control del inóculo micobacteriano. Igual que en el método de Canetti y cols., se considera que una cepa de *M.tuberculosis* es resistente a un fármaco, cuando lo sea más del 1% de la población micobacteriana. Es más sencillo de realizar y

ofrece el resultado a las 2-3 semanas de incubación a 35-37° C en 5-10% de CO₂. El medio de 7H11 se emplea cuando las cepas de *M.tuberculosis*, en general resistentes, crecen mal en medio de 7H10. Este método tiene una importante implantación en Estados Unidos.

Sistema E-Test. (PDM Epsilometer; AB Bio-disk, Sola, Suecia)

Se dispone de tiras impregnadas con concentraciones crecientes de fármaco. La suspensión micobacteria se inocula sobre placas de 7H10 de Middlebrook. Tras incubar durante 24 horas en estufa, se coloca la tira de E-test y se vuelve a incubar a 35-37° C. La concentración mínima inhibitoria de cada fármaco es aquella que inhibe el crecimiento de la cepa. Las ventajas principales del método son la sencillez de realización y que el resultado se obtiene a los 5-10 días. El inconveniente principal es que no es fácil leer el resultado y la posibilidad de contaminación tanto de la placa como de la persona que lo manipula⁷⁶. No es un método aprobado por los organismos internacionales para el estudio de la susceptibilidad de *M.tuberculosis*.

Sistema BACTEC 12B (Becton-Dickinson Microbiology Systems, USA)

Ya se ha explicado previamente el fundamento del sistema radiométrico BACTEC 12B. Este sistema se adaptó para la realización del estudio de sensibilidad de *M.tuberculosis*. Cada frasco de BACTEC 12B se inocula con 0,1 mL de inóculo micobacteriano y 0,1 mL de cada uno de los fármacos a estudio y otro frasco control con 0,1 mL de una dilución 1/100 del inóculo micobacteriano. Si la cepa de *M.tuberculosis* crece antes en el frasco con algún fármaco que en el frasco control, será porque más del 1% de su población será resistente a dicho fármaco y por lo tanto la cepa será resistente a dicho fármaco. La ausencia de crecimiento en un frasco con fármaco indica que la cepa es sensible a dicho fármaco.

Es un método muy utilizado por su sencillez, por la rapidez en que se obtienen resultados (4-14 días), su reproducibilidad y la concordancia entre los resultados obtenidos y los del método clásico de las proporciones^{34,35,74}.

En 1995, Woods y cols.⁷⁷ hallaron en una encuesta nacional que en Estados Unidos el 70% de los laboratorios empleaban este sistema radiométrico para realizar antibiogramas y el 30% restante se decantaba por medios sólidos, fundamentalmente medios con agar Middlebrook.

Sistemas líquidos automatizados (BACTEC MGIT 960, MB-BacT, ESP II)

Ya hemos señalado previamente que, los sistemas líquidos automatizados citados, tienen algunas ventajas sobre el BACTEC 12B, como son el hecho de no generar residuos radiactivos, y que al estar automatizados son menos laboriosos que los sistemas radiométricos. Por ello, se han intentado adaptar al estudio de la resistencia de *M.tuberculosis* a los quimioterápicos. En general, se basan en el método de las proporciones, adaptado de manera similar al método del BACTEC 12B, y una cepa se considera que es resistente a un fármaco cuando lo es el 1% de su población.

El sistema BACTEC MGIT 960, una versión automatizada del MGIT ha sido evaluado y se demuestra que los resultados obtenidos son similares a los del sistema BACTEC 460 TB radiométrico. Recientemente, ha sido aprobado por la FDA estadounidense y es probable que próximamente desplace al sistema radiométrico.

Método de microdilución en caldo

Se pretende determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada fármaco a la cepa en estudio. Se emplea caldo de Middlebrook 7H9 y algunos autores han sugerido el empleo de colorante azul de Alamar o de bromuro de

difeniltetrazolio para facilitar la lectura. Permite detectar la resistencia a la rifampicina en sólo 3 días^{78,79}. No es un método validado por los organismos internacionales.

Estudios de susceptibilidad por nuevas tecnologías.

Son métodos que no han sido aprobados y que han surgido ante la necesidad imperiosa de detectar cepas multirresistentes lo más rápidamente posible. Estas nuevas tecnologías (citometría de flujo, luciferase reporter phage assay y el sistema PhaB con fagos, etc.) permiten obtener resultados antes de una semana, en ocasiones en un día.

El sistema PhaB (phage amplified biologically) de la casa comercial Bistec Diagnostic, Reino Unido usa un micobacteriófago capaz de infectar a *M.tuberculosis* y *M.smegmatis*⁸⁰. Se incuba la cepa de *M.tuberculosis* a estudio en medio líquido 7H10 de Middlebrook con un quimioterápico durante 3 días. Entonces, se añade el micobacteriófago que infecta en una hora a las micobacterias vivas (o sea, resistente al quimioterápico), pero no a las que han sido muertas por el quimioterápico. Se inactiva el micobacteriófago que no haya penetrado en el bacilo tuberculoso vivo. A continuación, el medio con micobacterias y fagos internos se añade a un medio con un cultivo confluyente de *M.smegmatis* y se incuba durante 24 horas. Si se observan calvas, por lisis del *M.smegmatis*, significa que había fagos vivos o lo que es lo mismo que el bacilo tuberculoso era resistente al fármaco. Es un sistema sencillo, rápido (4 días), barato y que no requiere un instrumental costoso. Su concordancia con el método de las proporciones es buena para la rifampicina (95%), pero no así para la isoniazida (85%).

La citometría de flujo proporciona resultados a las 24-30 horas, es sencillo de realizar y precisa de reactivos baratos. Sin embargo, cuenta con importantes inconvenientes como el elevado costo del citómetro y, sobre todo la necesidad de trabajar en un nivel 3 de bioseguridad, lo que dificulta su implantación general.

No está suficientemente validado, aunque en el estudio de Kirk y cols.⁸¹ se obtuvieron resultados equivalentes a los de los métodos de referencia.

El sistema de "luciferase reporter phage assay" emplea micobacteriófagos TM4 y ha sido evaluado por Jacobs y cols.⁸².

Estudio de la sensibilidad por técnicas genotípicas

Se acepta que las resistencias de los bacilos tuberculosos a los quimioterápicos ocurren por mutaciones cromosómicas. Se postula que, en ciertos casos, las alteraciones en la permeabilidad de la pared o la presencia de fagos puedan jugar algún papel, aún no esclarecido. Por lo tanto, la detección de las mutaciones responsables de la resistencia puede ser una forma rápida de predecirla. Ello requiere un profundo conocimiento de las regiones del *M.tuberculosis*, donde ocurren las mutaciones responsables de la resistencia a cada quimioterápico. Este conocimiento sigue siendo parcial en la actualidad, aunque se ha avanzado mucho en los últimos años⁸³⁻⁸⁵.

Las mutaciones del genoma de *M.tuberculosis* que confieren resistencia a la isoniazida residen en 4 dianas del genoma: el gen *katG*, el gen *inhA* y su región reguladora, la región intergénica de los genes *oxyR-ahpC* y en el gen *kasA*. La diana *inhA* está relacionada con cambios en el metabolismo de los ácidos micólicos y el resto de las dianas codifican actividades del metabolismo oxidativo. Las dianas más importantes son el gen *katG* y el gen *inhA*. Las mutaciones en el gen *katG* pueden causar una resistencia de alto grado, provocando que la CMI pueda ser superior a 1 mcg/mL de isoniazida, y una pérdida de la actividad catalásica- peroxidásica, con posible pérdida de capacidad de permanencia intracelular y por lo tanto de capacidad infectiva de la cepa⁸³. Como se ha mencionado, sin embargo, hay cepas con alta resistencia que mantienen la capacidad enzimática citada^{8,23}. Las mutaciones en el gen *inhA* y su región reguladora confieren una baja resistencia y las CMI de la micobacteria suelen ser superiores a 0,1 mcg/mL, pero inferiores a 1 mcg/mL y

no suponen la pérdida de la capacidad catalásica- peroxidásica. Las alteraciones en la región intergénica de los genes *oxyR-ahpC* parece ser un mecanismo compensatorio a la existencia de mutaciones en el gen *katG* y frecuentemente van asociadas.

La mayoría de las mutaciones (85-90%) responsables de la resistencia a la rifampicina se hallan en una diana de pocos pares de bases, por lo que es fácil de analizar. Se hallan en el gen *rpoB* que codifica para la subunidad beta de la RNA polimerasa⁸⁵.

Entre el 72-97% de las mutaciones responsables de la resistencia a la pirazinamida ocurren en el gen *pncA*. Si la mutación está presente, el fármaco pirazinamida no se convierte en ácido pirazinoico, su forma activa, y por lo tanto no tiene actividad antituberculosa.

Las mutaciones responsables de la resistencia al etambutol se hallan en el conjunto de genes *EmbCAB*, que codifican para la actividad transferasa en la pared micobacteriana, alterando la permeabilidad a través de la pared micobacteriana.

Las dianas que confieren resistencia a la estreptomycinina se encuentra en los genes *rrs* y *rpsL* codificantes de 16S rRNA y la proteína ribosomal S12.

La detección de todas estas mutaciones supone un esfuerzo ímprobo y poco útil y práctico para el estudio de la sensibilidad de las cepas de una manera rutinaria en la micobacteriología clínica. Requiere de un instrumental y de un personal preparado no disponible en la mayoría de los centros. Sólo en el caso de la detección de mutaciones a la rifampicina, disponemos de reactivos comercializados y fáciles de usar. Por lo tanto, el estudio de estas mutaciones corresponde a laboratorios de referencia y a trabajos colaborativos.

Si se pueden adoptar aproximaciones prácticas al problema. Se ha propuesto, por ejemplo, analizar las dos dianas más importantes *katG* e *inhA* para la isoniazida y el gen *rpoB* para la rifampicina.

Disponemos de reactivos comerciales (INNO-LipA[®], Innogenetics, NV, Gante, Bélgica) para el estudio de las mutaciones en el gen *rpoB* responsables de la resistencia a la rifampicina. Se basa en un proceso de amplificación de la diana por PCR y una hibridación en fase sólida con una tira de nitrocelulosa, capaz de detectar más del 80% de las mutaciones. La técnica puede realizarse bien de la capa aislada como también directamente de una muestra clínica que sea positiva a la baciloscopia^{85,86}. Es una técnica rápida que, ante una resistencia a la rifampicina, nos debe hacer pensar que estamos ante una cepa multirresistente, ya que más del 90% de las cepas resistentes a la rifampicina lo son también a la isoniazida, y por lo tanto adoptar de manera urgente medidas de aislamiento y tratamiento adecuados del paciente.

1.3.2.f. Estudio de la sensibilidad de las micobacterias ambientales a los quimioterápicos.

Runyon¹ en el año 1953 mostró que otras micobacterias “anónimas”, diferentes de la tuberculosis podían producir enfermedad en los humanos y propuso las bases de su clasificación en aras de lograr identificarlas. Veinte años más tarde, Wolinsky²⁶ recopiló y sistematizó las enfermedades, y la localización de las mismas, que podían estar producidas por las micobacterias no tuberculosas. Asimismo, se ponían condiciones para saber cuándo los aislamientos eran responsables de la enfermedad o representaban meras colonizaciones. Con la aparición del sida quedó en evidencia que estas micobacterias, en especial *M. avium* complex, *M. genavense* y *M. kansasii* podían causar infecciones diseminadas severas.

El tratamiento de las enfermedades causadas por las micobacterias ambientales es diferente al de la tuberculosis. Antes de instaurar un tratamiento, es necesario confirmar que la cepa aislada no se encuentra como comensal, sino produciendo enfermedad. Las pautas para aseverar que la micobacteria ambiental esté produciendo enfermedad y las pautas de tratamiento para las micobacterias ambientales más importantes están claramente especificadas por la American Thoracic Society (ATS)²⁷.

Hasta el momento, ningún sistema "in vitro" está aceptado por los organismos internacionales para el estudio de la sensibilidad de las micobacterias ambientales. Las pautas de tratamiento se basan en los resultados obtenidos con los tratamientos "in vivo".

El método de las proporciones de Canetti y cols.² y su adaptación al sistema BACTEC 12B no son útiles para conocer la sensibilidad de las cepas. Por otra parte, la determinación de la CMI a cada quimioterápico, en cierta manera, puede sugerir su eficacia "in vivo". La CMI puede ser determinada tanto por métodos de dilución en medio sólido de 7H10 de Middlebrook, por técnica de microdilución en caldo 7H9, o por el sistema BACTEC 12B con el empleo de diferentes concentraciones de antibiótico.

Para el tratamiento de la enfermedad producida por *M.kansasii* se recomienda el empleo de isoniazida, rifampicina y etambutol durante 18 meses como mínimo. La ATS²⁷ aconseja el estudio de la sensibilidad sólo frente a rifampicina, ya que los métodos para los otros quimioterápicos no están estandarizados. Para determinar la sensibilidad a rifampicina puede utilizarse el método de las proporciones en agar 7H10 de Middlebrook^{25,27}.

Para el tratamiento de las linfadenitis cervicales causadas por micobacterias ambientales (*M.scrofulaceum*, *M.avium*, *M.intracellulare*, etc.) se recomienda la exéresis quirúrgica y no se precisa la instauración de tratamiento quimioterápico.

El tratamiento de la infección diseminada por *M.avium* complex se logra con la asociación de un macrólido (claritromicina, azitromicina), etambutol y rifabutina o una quinolona o amikacina. Para la profilaxis son de empleo común la claritromicina o el etambutol. La ATS²⁷ no recomienda el estudio de la sensibilidad de manera rutinaria. En todo caso, podría ser de interés comprobar que la CMI a la claritromicina es inferior a 32 mcg/mL. Siddiqi y cols.⁸⁷ emplean un método de macrodilución para ello, mientras que Gómez-Flores y cols.⁸⁸ encuentran que el método de microdilución colorimétrico con bromuro de dimetil-tiazol-difenil tetrazolio es un método sencillo, rápido y reproducible para los test de sensibilidad rutinarios de *M.avium*, así como también lo preconizan Telle y cols.⁸⁹.

Las micobacterias patógenas de crecimiento rápido (*M.fortuitum*, *M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.mucogenicum*) causar un amplio abanico de enfermedades, aunque predominantemente infecciones cutáneas. Su tratamiento se instaura con antibióticos convencionales, según los resultados obtenidos en los estudios de sensibilidad "in vitro". En ocasiones, debe ir asociado al desbridamiento quirúrgico. Los estudios de sensibilidad se realizan por técnica de microdilución en caldo Mueller-Hinton frente a cefoxitina, imipenem, amikacina, doxiciclina, quinolonas fluoradas y claritromicina^{90,91}.

1.3.2.g. Aplicación de técnicas de biología molecular en estudios epidemiológicos de la tuberculosis

El estudio de la transmisión del bacilo tuberculoso entre la población ha sido analizado, hasta fecha reciente, por métodos de epidemiología clásica como es el estudio de contactos. Este estudio se practica siguiendo la sistemática de los círculos concéntricos. Una vez detectado un caso índice de paciente con enfermedad tuberculosa se examinan a las personas convivientes más cercanas (familiares, compañeros, etc.). Así se conoce si otras personas próximas han adquirido también la enfermedad. Pero carecíamos de marcadores

epidemiológicos potentes para saber si las cepas aisladas de los pacientes eran iguales o no, o si la cepa aislada en un enfermo era procedente de una reactivación de una tuberculosis previa o bien una infección reciente. Podíamos recurrir a comparar la resistencia antituberculosa, poco discriminativa ya que la mayoría de las cepas son sensibles a los fármacos. También podíamos recurrir al estudio de la susceptibilidad a micobacteriófagos, que presenta, asimismo, limitaciones importantes, derivadas de su bajo poder discriminativo.

En la actualidad, el empleo de técnicas de biología molecular permite establecer con precisión las cepas circulantes en una población. Los métodos que disponemos son el estudio del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), o bien el "spoligotyping". Estos marcadores epidemiológicos pueden utilizarse para: a) conocer el patrón epidemiológico de las cepas de *M.tuberculosis* presentes en la población b) la identificación y control de los brotes epidémicos c) la diferenciación entre reactivaciones y reinfecciones exógenas y d) el estudio de las contaminaciones cruzadas entre muestras en el laboratorio.

RFLP.

Es el marcador más utilizado. El genoma de *M.tuberculosis* contiene frecuentemente un elevado número de copias del segmento de inserción IS6110, entre 5 y 20, localizadas en posiciones variables a lo largo del cromosoma, debido a su capacidad de transposición. La localización de estos IS es estable en cada cepa del bacilo de Koch, pero hay muchos patrones diferentes entre las diferentes cepas. Por lo tanto, el estudio de los RFLP es un carácter estable pero muy discriminativo entre cepas no relacionadas epidemiológicamente. Las cepas relacionadas epidemiológicamente tienen un patrón idéntico, y se puede establecer fácilmente que pertenecen a un mismo clon. En ocasiones (menos del 5% de las cepas), las cepas no tienen ninguna copia del IS6110. Se ha llegado a un consenso para realizar el RFLP de igual manera, de modo que los resultados obtenidos con cada cepa puedan

incorporarse a una base de datos común y todas las cepas europeas puedan compararse entre sí, lo que ayudaría a detectar posibles diseminaciones de alguna cepa a nivel europeo o mundial⁹².

En caso de cepas con menos de 5 bandas en el RFLP, deberíamos emplear marcadores moleculares diferentes, como el "spoligotyping", "direct repeat" y PGRS⁹³.

1.3.3 ¿QUÉ DEBE OFRECER HOY EN DÍA EL LABORATORIO DE MICOBACTERIOLOGÍA?

El laboratorio de microbiología dispone en el momento actual de muchas posibilidades técnicas, pero algunas de ellas son caras y no se pueden usar de manera totalmente rutinaria. Por otra parte, se han descrito brotes de tuberculosis multirresistente que deben ser detectados lo más urgentemente posible, para cortar la cadena epidemiológica de transmisión y no se extiendan entre la población.

Con ello, quiero reseñar que es absolutamente necesaria la estrecha relación entre los clínicos, epidemiólogos y microbiólogos para poder ofrecer todas las técnicas posibles, cuando haga falta, a un precio sensato y socialmente justificable. Algunas técnicas como la amplificación genética y los estudios de epidemiología molecular son de coste elevado y no está justificado su uso indiscriminado, pero han de estar disponibles para casos concretos y especiales.

Tenover y cols.²⁴ nos preguntan si nuestro laboratorio de micobacteriología está preparado para afrontar los retos de las micobacteriosis de hoy en día. Lógicamente cada laboratorio debe ofrecer servicios diferentes dependiendo a la población u hospital a la que ofrece sus servicios y ya Kubica y cols.⁹⁴ y la ATS exponían lo que debe ofrecer cada laboratorio según el nivel local, regional o de referencia al que perteneciera.

Consideramos que un laboratorio general de micobacterias tendría que ofrecer las prestaciones, con carácter general, que se indican a continuación.

El resultado de la baciloscopia, previa tinción con Ziehl-Neelsen o auramina O, debe entregarse al clínico antes de las 24 horas de la recepción de la muestra en el laboratorio. Si el clínico indicara el examen como "urgente", ante la sospecha de un paciente con cavitación pulmonar, hemoptisis o paciente con sida, el resultado no debería tardar más de una hora.

Las técnicas de amplificación son caras y por lo tanto solamente se practicarán de común acuerdo con el clínico y en aquellos casos especiales que lo requieran. En estos casos importantes, sería aconsejable que se obtuviera el resultado antes de las 48 horas de la recepción de la muestra.

Tenover y cols.²⁴ señalan que el aislamiento por cultivo de las micobacterias debe lograrse antes de los 15 días. Para el cultivo deben utilizarse medios sólidos y medios líquidos. Los medios sólidos serán el medio de Löwenstein-Jensen o el 7H10 de Middlebrook. Para el cultivo en medio líquido son eficaces tanto los medios radiométricos (BACTEC 12B) como los medios no radiométricos (MGIT, MB-BacT, ESP II).

La identificación de la micobacteria aislada ha de lograrse antes del mes de la recepción de la muestra. Para ello, disponemos de sistemas rápidos basados en biología molecular, como son las sondas AccuProbe a *M.tuberculosis*, *M.kansasii*, *M.avium* complex y *M.gordoniae*⁷¹ o las técnicas de identificación basadas en hibridación en fase sólida (Inno-LipA o GeneType)⁵⁷, que incluso identifican directamente del crecimiento en medio líquido. Las especies no identificadas por estos sistemas pueden serlo, a partir de colonias crecidas en medio sólido, mediante técnicas bioquímicas, cromatográficas o de secuenciación.

Los estudios de sensibilidad de *M.tuberculosis* no tienen necesariamente que realizarse en todos los aislamientos. Ya se ha indicado anteriormente las situaciones en que se debiera conocer la sensibilidad de la cepa aislada. En estos casos, el antibiograma debiera conocerse antes de los 30 días de la recepción de la muestra clínica. Para ello, hace falta el empleo del sistema radiométrico BACTEC 12B o los sistemas líquidos automáticos que hayan sido validados por los organismos internacionales, como el BACTEC MGIT 960.

Los estudios de sensibilidad a las micobacterias ambientales sólo se realizarán en centros de referencia y en las situaciones ya indicadas.

La homología de las cepas de *M.tuberculosis* se determinará por técnicas genotípicas como el RFLP y el "spoligotyping" en centros de referencia cualificados cuando haya una necesidad epidemiológica⁹³.

2. OBJETIVOS Y CONTENIDO DE LA TESIS

2.1 Justificación y objetivos

En esta tesis queremos profundizar en diferentes aspectos del diagnóstico de las micobacterias, continuando una línea de aportaciones previas, que se desarrollan en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona.

En una tesis, previamente presentada por el Dr. Freddy Omar, se investigaba sobre la aportación de las técnicas de amplificación génica en el diagnóstico rápido de la enfermedad tuberculosa. Se evaluó la utilidad del AMTDT de Gen-Probe, de Amplicor y de Cobas Amplicor de Roche y del LCxMTB en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar.

En la presente tesis se estudian otros aspectos del diagnóstico de micobacterias como son:

- A. la utilidad de nuevas técnicas de descontaminación para el cultivo de micobacterias. Estudio de la descontaminación de las muestras mediante el procesamiento con CB₁₈-carboxypropylbetaine
- B. la utilidad de técnicas de amplificación de DNA y RNA en muestras de tejido pleural parafinado en el diagnóstico de la tuberculosis pleural
- C. la eficacia del sistema de cultivo líquido no radiométrico MB-BacT[®] en el cultivo de micobacterias

2.1.A. Utilidad de nuevas técnicas de descontaminación para el cultivo de micobacterias. Estudio de la descontaminación de las muestras mediante el procesamiento con CB₁₈- carboxypropylbetaine

Las muestras clínicas procedentes de lugares anatómicos que contienen flora comensal han de ser descontaminadas para que sea factible el aislamiento de las micobacterias por cultivo.

Actualmente, el procesamiento más generalizado consiste en el empleo de hidróxido sódico y citrato de sodio (como sustancias esterilizantes de la flora comensal) y N-acetil-L-cisteína (como agente licuante de las muestras) con posterior neutralización mediante tampón fosfato⁶⁷. Durante muchos años, el sistema más utilizado en Europa fue el preconizado por Tacquet y Tison³⁰, que empleaba el dodecil-sulfato de sodio como licuante e hidróxido sódico al 1% como sustancia esterilizante. Ambos sistemas de descontaminación están ampliamente evaluados y se sabe que funcionan razonablemente bien tanto para realizar el cultivo de las micobacterias como para la amplificación génica de *M.tuberculosis*. Sin embargo, ambos métodos muestran también algunos defectos bien evidentes. Está suficientemente probado que, además de esterilizar la flora comensal, también matan el 80-90% de las micobacterias, siendo especialmente agresivos para las micobacterias ambientales. Ello puede llevar a obtener resultados negativos en muestras que contienen pocas micobacterias.

Por lo tanto, es importante investigar sobre técnicas de descontaminación que sean menos agresivas que las citadas. Con esta intención, en esta tesis se propone el estudio comparativo entre un nuevo sistema de descontaminación con CB₁₈- carboxypropylbetaine (CB-18) y un sistema ampliamente utilizado en Europa, como ha sido el sistema de dodecil-sulfato de sodio e hidróxido sódico según Tacquet y Tison³⁰.

También en un segundo artículo se pretende analizar los contaminantes más frecuentes usando la técnica de CB-18, con objeto de buscar las soluciones para que las contaminaciones sean menos frecuentes y por tanto se aíslen más micobacterias a partir de las muestras.

2.1.B. Utilidad de técnicas de amplificación de DNA y RNA en muestras de tejido pleural parafinado para el diagnóstico de la tuberculosis pleural

La tuberculosis pleural es una de las manifestaciones clínicas más frecuentes de la tuberculosis. La especificidad de las manifestaciones clínicas, de la radiología y de los análisis bioquímicos (proteínas, glucosa, etc.) y los recuentos de leucocitos y linfocitos tienen poca sensibilidad y especificidad y obligan a realizar exámenes microbiológicos e histológicos para confirmar el diagnóstico.

La presencia de líquido pleural linfocitario, una relación de linfocitos/neutrófilos superior a 0,75, la presencia de granulomas en la biopsia pleural, los niveles de adenosina desaminasa (ADA) superior a 40 UI/L, el interferón- gamma superior a 3,7 U/mL y un test de tuberculina superior a 5 mm., asociadas a manifestaciones clínicas compatibles ayudan a establecer el diagnóstico de tuberculosis pleural⁹⁵.

El diagnóstico de seguridad es alcanzado por el aislamiento de *M.tuberculosis* del líquido o de la biopsia pleural. Ambos tipos de muestras son paucibacilares. Como la sensibilidad del cultivo del líquido pleural para micobacterias es del 20-60% y requiere un mes de incubación para obtener un resultado positivo y la baciloscopia es positiva en menos del 10% de los pacientes con pleuritis tuberculosa, fuerzan al clínico a realizar una biopsia pleural para confirmar el diagnóstico. El análisis histológico muestra granulomas en el 85-95% de las biopsias pleurales y el cultivo de la biopsia es positivo en el 40-70% de las pleuritis, en un estudio realizado en nuestro hospital⁹⁵. Los principales

inconvenientes del cultivo son esta baja sensibilidad y la tardanza en obtener los resultados del cultivo (3-6 semanas). Ello obliga a buscar sistemas de diagnóstico más rápidos y sensibles.

Las técnicas de amplificación génica han demostrado poseer una buena sensibilidad y una excelente especificidad en el diagnóstico de la tuberculosis respiratoria, así como en la extrarrespiratoria.

Por lo tanto, también estas técnicas de amplificación pueden ser de utilidad en el diagnóstico de la tuberculosis pleural y más teniendo en cuenta que pueden ofrecer un diagnóstico de seguridad en uno o dos días, en vez de las 3-6 semanas que requiere el cultivo.

Nuestro objetivo es evaluar dos técnicas comercializadas como la LCxMTB *M.tuberculosis* Assay (LCxMTB), técnica de amplificación de DNA, y la Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (AMTDT) de Gen-Probe Inc., San Diego, Calif., una técnica de amplificación de RNA en el diagnóstico de la tuberculosis en muestras de biopsias pleurales parafinadas.

Cada año se dispone de pocas muestras de biopsia pleural. Por ello, se ha recurrido a analizar muestras de biopsia pleural analizadas en nuestro hospital desde el año 1984 hasta el 1995 y conservadas parafinadas en el Servicio de Anatomía Patológica.

Estudiar por amplificación tantas muestras permite conocer la eficacia de estas técnicas en el diagnóstico rápido y conocer lo que se puede esperar de las mismas.

2.1.C. Eficacia del sistema de cultivo líquido no radiométrico MB-BacT[®] en el cultivo de micobacterias

Clásicamente el cultivo de las micobacterias se realizaba en medio sólido de Löwenstein-Jensen. Su gran ventaja consiste en que permite observar la morfología de la colonia y por lo tanto presuponer si se trata o no del bacilo tuberculoso. Asimismo, en este medio se puede conocer la sensibilidad de la cepa aislada por el método de proporciones de Canetti y cols.², que es el método de referencia. Las micobacterias se obtienen entre los 20 y 40 días, lo que supone un importante retraso diagnóstico.

Para obviar esta importante desventaja de los medios sólidos se creó el medio radiométrico BACTEC 12B. Aporta un diagnóstico rápido, una alta sensibilidad en el aislamiento de las micobacterias ambientales y permite la realización sencilla de la susceptibilidad de la cepa de *M.tuberculosis* aislada⁵⁵. Su mayor inconveniente es el empleo de sustancias radiactivas y los residuos que provoca. Asimismo, es un sistema laborioso y con posibilidad de contaminaciones entre muestras por el empleo de agujas comunes⁵⁸.

Las diferentes casas comerciales han sacado al mercado sus propios sistemas no radiométricos durante la última década. En el artículo "Comparison of a nonradiometric system with BACTEC 12B and culture on egg-based media for recovery of mycobacteria from clinical specimens. Manterola JM, Gamboa F, Padilla E, Lonca J, Matas L, Hernández A, Giménez M, Cardona PJ, Viñado B, Ausina V. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17:773-777" hemos querido valorar la capacidad del sistema MB-BacT de la casa Organon (hoy en día, BioMérieux) para el aislamiento de las micobacterias y lo hemos comparado con el sistema de referencia BACTEC 12B y el medio sólido de Löwenstein-Jensen.

2.2 Utilidad de nuevas técnicas de descontaminación para el cultivo de micobacterias. Estudio de la descontaminación de las muestras mediante el procesamiento con C₁₈-carboxypropylbetaine

En la presente tesis presentamos los resultados obtenidos con un nuevo producto CB-18 para la descontaminación de muestras respiratorias. La experiencia con CB-18 la hemos plasmado en los siguientes artículos:

1- Comparison of the sodium dodecyl sulfate-sodium hydroxide specimen processing method with the C18-carboxypropylbetaine specimen processing method using the MB/BacT liquid culture system. Manterola JM, Thornton CG, Padilla E, Lonca J, Corea I, Martínez E, Ausina V. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22:35-42

2- Análisis of the contaminant spectrum in the MB/BacT liquid culture System following C18-Carboxypropylbetaine specimen processing. Manterola JM, Thornton CG, Padilla E, Lonca J, Pérez M, Quesada MD, Ausina V. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003;22:507-508

En el primero de los artículos se presenta la experiencia obtenida al descontaminar 1201 muestras, entre Marzo de 1999 y Diciembre de 1999, con el nuevo sistema CB-18, descrito por Thornton y cols.^{97,98} y compararlo con un método habitual en Europa como el de Tacquet-Tison³⁰.

Todas las muestras fueron divididas aproximadamente a partes iguales y una mitad fue tratada con el método de CB-18 y la otra mitad con dodecil-sulfato-sódico e hidróxido sódico, según Tacquet-Tison. Entre las muestras se incluyen 1141 muestras respiratorias, 29 muestras de tejidos y 31 muestras más de otras localizaciones.

Los procedimientos de descontaminación siguen las recomendaciones de los autores que describieron ambos sistemas de descontaminación^{30,97,98}. Como se indica en el primero de los artículos, hacia la mitad del estudio se realizó una modificación en el sistema de CB-18, ya que se había apreciado que la concentración de CB-18 interfería en la sensibilidad del medio de cultivo líquido.

Del sedimento obtenido, tras el procesamiento con ambos sistemas de descontaminación, se realizaba una extensión que se teñía por la tinción de auramina O⁴⁰ y los frotis en que se demostraba la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes eran de nuevo coloreados por la tinción de Ziehl-Neelsen para corroborar la presencia de micobacterias.

Los sedimentos eran asimismo inoculados en medios de cultivo sólidos (medio de Löwenstein-Jensen tras decontaminar con Tacquet-Tison y medio 7H11 selectivo tras decontaminar con CB-18) y medios líquidos no radiométricos de MB-BacT. Se incubaban a 35-37°C durante dos meses y los frascos de MB-BacT considerados negativos eran sistemáticamente resembrados en tubos de medio de Löwenstein-Jensen.

Las micobacterias aisladas eran identificadas por procedimientos bioquímicos convencionales^{31,67}, por cromatografía en capa fina y por cromatografía de gases³⁷ y por pruebas génicas (AccuProbe; Gen-Probe, USA)^{57,71}.

En el primero de los artículos (Comparison of the sodium dodecyl sulfate-sodium hydroxide specimen processing method with the C18-carboxypropylbetaine specimen processing method using the MB/BacT liquid culture system. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22:35-42) se presentan los resultados comparativos obtenidos por ambos sistemas de descontaminación en cuanto a:

- la mayor o menor sensibilidad obtenida en el examen microscópico
- la sensibilidad obtenida en el cultivo de *M.tuberculosis* y de las micobacterias ambientales

- la rapidez en la obtención de los cultivos positivos de *M.tuberculosis* y de las micobacterias ambientales
- la comparación de los resultados obtenidos en los medios sólidos y en los medios líquidos
- la comparación de los resultados obtenidos con las dos maneras en que se empleó el reactivo de CB-18
- la comparación de las contaminaciones según el sistema de descontaminación empleado

Es muy importante conseguir que cualquier sistema de descontaminación permita obtener que la proporción de muestras contaminadas sea inferior al 5% de las mismas. En el segundo de los artículos (Análisis of the contaminant spectrum in the MB/BacT liquid culture System following C₁₈-carboxypropylbetaine specimen processing. Manterola JM, Thornton CG, Padilla E, Lonca J, Pérez M, Quesada MD, Ausina V. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003;22:507-508 nos fijamos en los microorganismos aislados como contaminantes tras el procesamiento con el sistema de CB-18. Ciento cinco muestras fueron consideradas como contaminadas en el medio líquido de MB-BacT tras la descontaminación con CB-18. Se analizan los 116 microorganismos contaminantes obtenidos en cultivo y las posibles causas para su crecimiento como contaminantes.

2.3 Utilidad de técnicas de amplificación de DNA y RNA en muestras de tejido pleural parafinado para el diagnóstico de la tuberculosis pleural

Diferentes técnicas de amplificación génica han mostrado su utilidad en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar⁹⁹. Estas técnicas de amplificación apenas han sido evaluadas para el diagnóstico de la tuberculosis pleural a partir de muestras de biopsia pleurales y no lo han sido con productos comercializados sino con PCR "home made"^{44,100}.

El objetivo del artículo "Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin-embedded pleural biopsy specimens by commercial ribosomal RNA and DNA amplification kits. Ruiz Manzano J, Manterola JM, Gamboa F, Calatrava A, Monsó E, Martínez C, Ausina V. Chest 2000; 118:648-655" es evaluar la sensibilidad y especificidad de dos técnicas de amplificación génica comercializadas para el diagnóstico de la tuberculosis de muestras de biopsias pleurales fijadas en formalina y parafinadas.

Del archivo histórico (entre 1984 y 1995) del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona se obtuvieron muestras de 74 bloques parafinados de biopsias pleurales de otros tantos pacientes. Cincuenta y siete de las muestras procedían de pacientes con diagnóstico previo de tuberculosis pleural, basándose en criterios clínicos, bioquímicos, hematológicos e histológicos⁹⁵. Asimismo, se incluyeron 17 muestras de biopsias pleurales, como "controles negativos", correspondientes a pacientes con diagnóstico histológico de cáncer. Se había realizado cultivo para micobacterias de 39 muestras de biopsias pleurales frescas de los 57 pacientes con diagnóstico de tuberculosis pleural. El cultivo de las muestras, su tinción e identificación de las micobacterias aisladas se realizó según la metodología estándar en los laboratorios de micobacteriología clínica.

Las secciones de biopsias pleurales fueron desparafinadas y digeridas. Posteriormente, fueron analizadas por dos técnicas de amplificación génica: Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (AMTDT) de Gen-Probe Inc., San Diego, Calif y el LCxMTB *M.tuberculosis* Assay (LCxMTB) de Abbott. Los test fueron realizados sobre las 74 muestras de biopsias, una vez desparafinadas y digeridas, según los protocolos indicados por ambas técnicas. Para el análisis estadístico de las sensibilidades obtenidas con ambos equipos se aplicó el test de McNemar, prueba que compara proporciones en datos apareados.

2.4 Eficacia del sistema de cultivo líquido no radiométrico MB-BacT® en el cultivo de micobacterias

En el artículo "Comparison of a nonradiometric system with BACTEC 12B and culture on egg-based media for recovery of mycobacteria from clinical specimens. Manterola JM, Gamboa F, Padilla E, Lonca J, Matas L, Hernández A, Giménez M, Cardona PJ, Viñado B, Ausina V. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17:773-777" analizamos la eficacia del sistema MB-BacT para el aislamiento de las micobacterias y la comparamos con la obtenida por el sistema radiométrico BACTEC 12B y el medio de cultivo sólido de Löwenstein-Jensen.

Para ello, se cultivaron 600 muestras (393 respiratorias y 217 extrarrespiratorias). Las muestras procedentes de territorios con flora comensal fueron descontaminadas con laurilsulfato de sodio (SDS) y sosa al 2%, según el método de Tacquet-Tison³⁰. Tras la digestión, neutralización y concentración de las muestras, éstas fueron sometidas a un lavado con tampón fosfato y vueltas a centrifugar para obviar el efecto deletéreo del SDS sobre el cultivo de las micobacterias en medio líquido⁵⁴. Las muestras fueron sembradas a partes iguales en el frasco del sistema MB-BacT, en un frasco BACTEC 12B y en dos tubos de medio sólido de Löwenstein-Jensen y de Coletsos. También del sedimento obtenido, tras la concentración, se practicó una extensión en un

portaobjetos que fue sometido a tinción de auramina O⁴⁰ y en caso de ser positiva a bacilos ácido-alcohol resistentes a confirmación posterior mediante la tinción de Ziehl-Neelsen.

Los medios líquidos del sistema MB-BacT y del BACTEC 12B fueron suplementados con la mezcla de enriquecimiento selectivo siguiendo las recomendaciones de las respectivas casas comerciales. Los frascos y los medios sólidos se incubaron durante dos meses a 35-37°C.

Las micobacterias aisladas se identificaron por métodos bioquímicos convencionales^{31,67}, por cromatografía gas-líquida y cromatografía en capa fina³⁷ y con el sistema de sondas AccuProbe de Gen-Probe, USA⁷¹.

Los porcentajes de aislamiento de los tres sistemas fueron evaluados por la modificación de McNemar de la ji al cuadrado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Utilidad de nuevas técnicas de descontaminación para el cultivo de micobacterias. Estudio de la descontaminación de las muestras mediante el procesamiento con CB₁₈ - carboxypropylbetaine

Se emplearon dos versiones de descontaminación con CB-18 con resultados muy similares, por lo que los resultados obtenidos se expondrán conjuntamente. Las diferencias obtenidas con las dos versiones se remarcarán posteriormente.

Se aislaron 154 micobacterias en las 152 (12,7%) muestras positivas del total de 1201 muestras analizadas por los sistemas de descontaminación de CB-18 y de Tacquet-Tison. Correspondían a 124 aislamientos de *M.tuberculosis*, 27 de micobacterias ambientales, 2 de *Nocardia asteroides* y uno de *Tsukamurella* sp, que se analizan como si fueran micobacterias ambientales. Las micobacterias ambientales incluían a *M.kansasii* (9), *M.xenopi* (5), *M.chelonae* (4), *M.fortuitum* (2), *M.gordonae* (2), *M.mucogenicum* (2), *M.avium* complex (1), micobacteria cromogénica de crecimiento rápido (1) y micobacteria no identificada (1).

La descontaminación por Tacquet-Tison³⁰ permitió una sensibilidad de la baciloscopia del 61,2%, un 4,4% superior a la sensibilidad de la baciloscopia tras descontaminación por CB-18, pero esta diferencia no alcanzó significación estadística ($P > 0,05$).

En la primera versión de CB-18 sólo el 21,8% de las baciloscopias-positivas se consideraron como positivas 4+, cuando lo eran el 72,4% de las baciloscopias-positivas en la técnica de Tacquet-Tison. En cambio, en la segunda versión de CB-18 el porcentaje de baciloscopias consideradas 4+ era del 64,7%, siendo el 68,6% tras Tacquet-Tison. Claramente se deduce que la segunda versión de CB-18 permite que aumente la cantidad de bacilos ácido-alcohol resistentes observados.

Tras descontaminar con CB-18 se aíslan el 96,1% de las micobacterias cultivadas, mientras que con Tacquet-Tison se aíslan el 84,2% de las mismas. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($P < 0,05$). La descontaminación por CB-18 también se muestra superior para el aislamiento de las micobacterias ambientales ya que se cultivan el 92,9% de las mismas en vez del 53,6% mediante la técnica de Tacquet-Tison ($P < 0,05$). En ambos casos, el incremento en la sensibilidad del cultivo es debido a las diferencias observadas en las muestras baciloscopia-negativas.

Para el cultivo de *M.tuberculosis*, ambas técnicas de descontaminación son similares y no se aprecian diferencias estadísticamente significativas (96,8% para CB-18 versus 91,1% para Tacquet-Tison).

Globalmente, las micobacterias se detectaron antes en el medio líquido MB-BacT tras descontaminar con Tacquet-Tison ($13,2 \pm 5,6$ días) que tras descontaminar con CB-18 ($15 \pm 8,8$ días), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. *M.tuberculosis* se aisló a los $12,8 \pm 4,8$ días tras descontaminar con Tacquet-Tison y a los $15,3 \pm 8,3$ días con CB-18, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. En cambio, las micobacterias ambientales se cultivaron antes tras descontaminarlas con CB-18 ($13 \pm 11,3$ días) que con Tacquet-Tison ($16,2 \pm 9,9$ días).

La sensibilidad obtenida con el medio líquido MB-BacT y el medio sólido fue similar tras seguir el proceso de descontaminación de Tacquet-Tison. Sin embargo, tras descontaminar con CB-18 se obtuvo una sensibilidad muy superior en el medio líquido MB-BacT que en el medio sólido 7H11 selectivo. Este incremento del 38,8% fue estadísticamente significativo.

Una de las más significativas diferencias entre ambos sistemas de descontaminación fue en el porcentaje de muestras contaminadas. De las 1201 muestras descontaminadas con CB-18, las contaminaciones en medio líquido de MB-BacT fueron de 105 muestras (8,7%) y de 52 muestras (4,3%) en el medio

sólido de 7H11 selectivo. Las contaminaciones fueron más frecuentes tras descontaminar con CB-18 que tras descontaminar por el método de Tacquet-Tison, donde las contaminaciones ocurrieron sólo en el 0,8% en medio de MB-BacT y en el 2,6% en medio de Löwenstein-Jensen.

Tras descontaminar con CB-18 se observó contaminación en 52 muestras sembradas en medio sólido de 7H11 selectivo de Middlebrook y en ellas se observaron 57 microorganismos contaminantes. Correspondían a *Candida* spp. (38,6%), bacilos gram-negativos (22,8%), hongos filamentosos (21,1%) y gram-positivos (15,8%). Los géneros más comunes fueron *Candida* spp (38,6%) y *Aspergillus* spp. (21,1%).

Se aislaron 116 microorganismos contaminantes de los 105 frascos de MB-BacT contaminados tras descontaminación por CB-18. El 62,1% de los contaminantes fueron gram-positivos, el 19,0% fueron gram-negativos el 14,7% fueron levaduras y el 3,4% fueron hongos filamentosos. Los microorganismos más frecuentes fueron especies del género *Streptococcus* (31%) y *Staphylococcus* (27,6%).

Se aprecia que el medio líquido MB-BacT contiene vancomicina a una concentración de 0,2 mcg/mL. Sin embargo, según Wiedemann y Grim¹⁰¹ sólo 2 de 227 aislados de cocos gram-positivos fueron sensibles a concentraciones de 0,25 mcg/mL de vancomicina. Por lo tanto, para disminuir las contaminaciones de cocos gram-positivos propugnamos que la concentración de vancomicina en el medio de MB-BacT sea incrementada hasta 1 mcg/mL. Esta concentración de vancomicina consigue disminuir el porcentaje de contaminaciones y parece que no afecta al porcentaje de aislamientos positivos ni al tiempo necesario para detectarse el cultivo positivo, según refieren Alados y cols.¹⁰²

3.2 Utilidad de técnicas de amplificación de DNA y RNA en muestras de tejido pleural parafinado para el diagnóstico de la tuberculosis pleural

La técnica AMTDT de amplificación de rRNA fue positiva en 30 de las 57 muestras de biopsias pleurales parafinadas de pacientes con tuberculosis. En cambio, la 17 muestras controles de pacientes sin tuberculosis dieron resultado negativo. Ello hace que la sensibilidad y especificidad del AMTDT sea de 52,6% y del 100%, respectivamente, en el diagnóstico de la tuberculosis pleural. La sensibilidad fue del 61,5% en las 13 muestras de biopsias pleurales que fueron positivas en la tinción de Ziehl-Neelsen en el estudio histológico.

La técnica LCxMTB de amplificación por reacción en cadena de la ligasa fue positiva en 36 de las 57 muestras de biopsias pleurales y ninguna de las 17 muestras control dio resultado positivo. Ello hace que la sensibilidad y la especificidad de la LCxMTB sean del 63,2% y del 100%, respectivamente. La sensibilidad fue del 69,2% en las 13 muestras con baciloscopia positiva en la biopsia pleural.

Las diferencias observadas entre el AMTDT y la LCxMTB no alcanzaron la significación estadística.

La amplificación génica fue positiva en el 35,1% de las muestras parafinadas con ambos sistemas de amplificación, un 17,5% sólo en el sistema AMTDT y un 28,1% sólo en el sistema LCxMTB. Alguno de los dos sistemas de amplificación fue positivo en el 80,7% de las muestras estudiadas.

El diagnóstico de tuberculosis pleural se había obtenido en 42 (73,7%) de los 57 pacientes mediante el examen microscópico o el cultivo de muestras de esputo, de líquido pleural o de biopsia pleural. Si a estos pacientes les añadiéramos los resultados positivos por amplificación de las biopsias pleurales, resultaría que se habría obtenido el resultado de seguridad de 55 de los 57 pacientes (96,5%).

Ambas técnicas de amplificación aportarían, por lo tanto, un 22,8% de diagnósticos de confirmación adicionales.

La amplificación de rRNA es teóricamente más sensible que la amplificación de DNA, ya que en la amplificación de rRNA hay aproximadamente 1000-2000 copias del segmento a amplificar. Nuestros resultados han sido superiores con la LCxMTB que con la amplificación de rRNA (AMTDT), aunque las pequeñas diferencias no han sido estadísticamente significativas.

La amplificación de las biopsias plurales ha ofrecido menores sensibilidades que las obtenidas con otros tipos de muestras. En las muestras respiratorias se ha constatado que la sensibilidad de las técnicas de amplificación es del 70-89%, siendo superior al 95% en las muestras baciloscopias positivas y del 50-65% en las muestras con baciloscopia negativa. La menor sensibilidad obtenida por nosotros en las muestras pleurales parafinadas ha de ser debida a diferentes razones. Por una parte, es conocida que las muestras de biopsias pleurales de los pacientes tuberculosos contienen pocos bacilos tuberculosos. Por otra parte, la necesidad de desparafinar los tejidos hace que en el proceso se pueda perder parte del ácido nucleico contenido en la muestra. En otras muestras paucibacilares parafinadas se han obtenido resultados parecidos a los nuestros. Degitz y cols.¹⁰³ observaron DNA de *M.tuberculosis* en 53,3% (8 de 15) muestras cutáneas parafinadas de pacientes con lupus vulgaris. Marchetti y cols.¹⁰⁴ trabajando con 4 sistemas de amplificación de muestras de autopsias llegan a obtener sensibilidades del 47 al 87%. Su análisis posterior demuestra que la sensibilidad de los diferentes sistemas de amplificación depende de la concentración de DNA en la muestra, del tamaño de la diana de amplificación, del número de copias de la diana de amplificación presentes en el gen de *M.tuberculosis* amplificado y de los inhibidores de la amplificación presentes en la muestra.

Postulamos que los métodos y sistemas de amplificación de muestras parafinadas han de ser mejorados de diferentes modos como:

1. La mejora de los métodos de fijación de las muestras con formalina neutra al 10%
2. La mejora de los sistemas de extracción del ácido nucleico
3. El uso de 450 mcL. de muestra (sistema AMTDT-II) en vez de 50 mcL en el sistema AMTDT-I
4. La inactivación los inhibidores de la amplificación
5. La elección las mejores dianas de amplificación
6. Aumentando el número de ciclos de amplificación
7. La adición de un control interno de amplificación
8. La automatización al máximo tanto la desparafinación de la muestra como la misma reacción de amplificación del ácido nucleico.

3.3 Eficacia del sistema de cultivo líquido no radiométrico MB-BacT® en el cultivo de micobacterias

Se aislaron 106 cepas de micobacterias (17,7%) de las 600 muestras procesadas. De ellas, 79 correspondieron a *M.tuberculosis* y 27 a micobacterias ambientales. El 64,1% de las muestras con cultivo positivo lo fueron también en la baciloscopia.

En el sistema MB-BacT se cultivaron el 94,3% de todas las micobacterias, frente al 90,6% en el BACTEC 12B y el 92,5% en los medios sólidos. En medio MB-BacT se recuperaron el 98,7% de las cepas de *M.tuberculosis*, en comparación con el 89,9% en BACTEC 12B y el 93,7% en los medios sólidos. El medio MB-BacT no permitió el aislamiento de dos cepas de *M.kansasii* y de dos cepas de *M.xenopi*. Todas estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

MB-BacT fue significativamente superior a los otros dos sistemas para el caso de las cepas de *M.tuberculosis* aisladas de muestras con baciloscopia negativa (96% en MB-BacT vs. 76% en BACTEC 12B y 88% en medio sólido).

El tiempo medio necesario para detectar el crecimiento de micobacterias fue de 11,7 días en el BACTEC 12B, de 14,2 días en MB-BacT y de 26,1 días en medios sólidos. En las muestras paucibacilares el MB-BacT detecta incluso antes que el BACTEC 12B (20,2 y 22,5 días, respectivamente).

Se procesaron 103 muestras de sangre y 14 aspirados de médula ósea y se aislaron 7 cepas de micobacterias. Éstas fueron recuperadas mejor en ambos medios líquidos (85,7%) que en los medios sólidos (71,4%) y antes en el BACTEC 12B (8,3 días) que en MB-BacT (11,8 días) y que en medio sólido (33,6 días).

Los porcentajes de contaminaciones fueron significativamente mayores en MB-BacT (5%) que en BACTEC y medios sólidos (1,5%). Las contaminaciones en MB-BacT fueron principalmente por microorganismos gram-positivos.

En general, podemos decir que el sistema MB-BacT cuenta con ventajas respecto al sistema BACTEC 12B, como son el uso de material no radiométrico, el hecho de ser totalmente automático, la posibilidad de conexión "on line" al sistema informático del laboratorio y que es mucho menos laborioso. Además, se ha mostrado como un sistema muy fácilmente manejable y robusto frente a diferentes circunstancias, como caídas de tensión de la luz, etc.

Su sensibilidad es similar a la del sistema radiométrico y detecta el crecimiento sólo unos dos días más tarde que el BACTEC 12B.

Las contaminaciones son superiores y ello indica la necesidad de ser suplementado con algún antibiótico frente a microorganismos gram-positivos.

4. CONCLUSIONES

4.1 Utilidad de nuevas técnicas de descontaminación para el cultivo de micobacterias. Estudio de la descontaminación de las muestras mediante el procesamiento con CB₁₈- carboxypropylbetaine

1. El sistema de descontaminación con CB-18 es un sistema fácil de implantar en la rutina de un laboratorio de micobacterias.
2. El procesamiento con CB-18 ofrece una sensibilidad algo inferior (4,4%) y una especificidad igual al sistema de Tacquet-Tison para la observación de micobacterias mediante la tinción del sedimento.
3. La segunda versión del procesamiento con CB-18, con incubación de 30 minutos, permite observar más micobacterias en los frotis teñidos, que la primera versión del sistema sin incubación.
4. Se obtuvo un aumento del 14% en el número de cultivos positivos a micobacterias, tras la descontaminación con CB-18 en comparación con la descontaminación por Tacquet-Tison.
5. Este incremento en los aislamientos fue exclusivamente debido a las muestras baciloscopia-negativas.
6. El aislamiento de *M.tuberculosis* ocurre 2,5 días más tarde cuando se descontamina con el sistema CB-18.
7. Tras descontaminación con CB-18, se aíslan más micobacterias en el medio de cultivo líquido MB-BacT que en el medio sólido de Löwenstein-Jensen en las muestras baciloscopia-negativas.
8. La contaminación en el medio MB-BacT fue muy superior (8,7% vs. 0,8%) tras descontaminar con CB-18 que con Tacquet-Tison, pero no tuvo influencia en los resultados de los cultivos.

9. Las contaminaciones en el medio MB-BacT, tras descontaminar con CB-18, fueron debidas fundamentalmente a cocos gram-positivos (estreptococos) y hongos.

10. Se recomienda la adición de 1 mcg/mL de vancomicina a los frascos del medio líquido MB-BacT para disminuir el porcentaje de contaminaciones por cocos gram-positivos.

4.2 Utilidad de técnicas de amplificación de DNA y RNA en muestras de tejido pleural parafinado para el diagnóstico de la tuberculosis pleural

1. Las técnicas de amplificación son útiles en el diagnóstico de seguridad de la tuberculosis pleural.
2. El rendimiento de ambas técnicas de amplificación, AMTDT y LCxMTB, fue muy similar.
3. La sensibilidad del AMTDT fue del 52,6% y del LCxMTB del 63,2%.
4. La especificidad de ambas pruebas fue del 100%.
5. Utilizando ambas pruebas conjuntamente se alcanza una sensibilidad del 80,7% en el diagnóstico de la tuberculosis pleural.
6. La sensibilidad alcanzada con las tinciones, los cultivos de las muestras respiratorias y las técnicas de amplificación de las biopsias pleurales fue del 96,5%.
7. Las técnicas de amplificación aportaron un 22,8% adicional de diagnósticos de seguridad de las tuberculosis pleurales.
8. Deben mejorarse las maneras de desparafinar y tratar las muestras, así como las técnicas de amplificación en aras de obtener mejores resultados.

4.3 Eficacia del sistema de cultivo líquido no radiométrico MB-BacT® en el cultivo de micobacterias

1. El sistema MB-BacT es un sistema no radiométrico para el cultivo de micobacterias, totalmente automático, rápido, cómodo de utilizar, robusto, fácilmente incorporable al laboratorio y con posibilidad de conexión "on-line" al sistema informático del laboratorio.
2. Este sistema muestra una sensibilidad similar al sistema radiométrico BACTEC 12B y al medio sólido de Löwenstein-Jensen para el aislamiento de las micobacterias.
3. El sistema MB-BacT se muestra significativamente superior para el aislamiento de *M.tuberculosis* a partir de muestras baciloscopia negativas.
4. Con la combinación del sistema MB-BacT y del medio de Löwenstein-Jensen se recuperaron todas las cepas de *M.tuberculosis*.
5. Algunas cepas de *M.xenopi* no dan resultado positivo en el sistema MB-BacT, a pesar de observarse su crecimiento y son recuperadas en la resiembra del frasco líquido de cultivo.
6. El aislamiento de las micobacterias ocurre una media de 2,5 días más tarde en el sistema MB-BacT que en el sistema radiométrico, pero 12 días antes que en el Löwenstein-Jensen.
7. El porcentaje de contaminaciones en el sistema MB-BacT fue superior que en los otros dos sistemas comparados.
8. Recomendamos que el sistema MB-BacT, igual que otros medios de cultivo líquidos, sea empleado en combinación con un medio de cultivo sólido.

9. Recomendamos a la casa comercial del sistema MB-BacT que añada algún antibiótico frente a microorganismos gram-positivos para reducir las contaminaciones.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin N Am* 1959; 43: 273-290
2. Canetti G, Rist N, Grosset J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par le méthode des proportions. *Méthodologie, critères de résistance, résultats, interpretation. Rev Tuberc Pneumol (Paris)* 1963; 27 :217-272
3. Raviglione MC, Snider DE Jr, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 1995; 273: 220-226
4. Cantwell MF, McKenna MT, McGray E, Onorato IM. Tuberculosis and race/ethnicity in the United States: impact of socio-economic status. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157:1016-1020.
5. Weiss KB, Addington WW. Tuberculosis. Poverty's penalty. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157: 1011
6. Ausina V, Riutort N, Viñado B, Manterola JM, Ruiz Manzano J, Rodrigo C, Matas L, Jiménez M, Tor J, Roca J. Prospective study of drug-resistant tuberculosis in a Spanish urban population including patients at risk for HIV infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1995;14: 105-110
7. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220:868-870
8. Bloom BR, Murray CJL. Tuberculosis. Commentary on a reemergent killer. *Science* 1992; 257: 1055-1064

9. Chaisson RE, Schechter GF, Theuer CP, Rutherford GW, Echenberg DF, Hopewell PC. Tuberculosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Clinical features, response to therapy, and survival. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:570-574.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons-Florida and New York, 1988-1991. *MMWR* 1991;40: 585-591
11. Centers for Disease Control and Prevention: Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care facilities. *MMWR* 1994;43: 1-132
12. Dooley SW, Jarvis WR, Martone WJ, Snider DE Jr. Multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Intern Med* 1992;117:257-259
13. Frieden TR, Fujiwara PI, Washko RM, Hamburg MA. Tuberculosis in New York City- turning the tide. *N Engl J Med* 1995;333:229-233
14. Weinstein JW, Hierholzer WJ Jr. Control of multidrug-resistant tuberculosis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 1996;9: 276-279
15. Smith PG, Moss AR. Epidemiology of tuberculosis. *In: Tuberculosis: pathogenesis, protection and control.* Bloom BR (ed). 1994. AMS. Washington. pág: 47-58
16. McKenna MT, McCray E, Onorato I. The epidemiology of tuberculosis among foreign-born persons in the United States, 1986 to 1993. *N Engl J med* 1995;332:1071-1076.

17. Vallès X, Sánchez F, Panella H, García de Olalla P, Jansà JM, Caylà JM. Tuberculosis importada: enfermedad emergente en países industrializados. *Med Clín (Barc)* 2002;118:376-378
18. Frieden TR, Sterling T, Pablos-Méndez A, Kilburn JO, Cauthen GM, Dooley SW. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med* 1993; 328:521-526.
19. Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, Fujiwara PL, Crawford JT, Nivin B et al. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes. *JAMA* 1996; 276:1229-1235.
20. Snider DE Jr, Roper WL. The new tuberculosis. *N Engl J Med* 1992;26: 703-705
21. Mitchinson DA, Dickinson JM. Bacterial mechanisms in short-course chemotherapy. *Bull Intern Union Against Tuberc.* 1978;53: 254-259
22. Bifani PJ, Plikaytis BB, Kapur V, Stockbauer K, Pan X, Lutfey ML, Moghazeh SL, Eisner W, Daniel TM, Kaplan MH, Crawford JT, Musser JM, Kreisworth BN. Origin and interstate spread of a New York city multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *JAMA* 1996; 275:452-457
23. Victor TC, Warren R, Beyers N, van Helden PD. Transmission of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a high incidence community. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16: 548-549
24. Tenover C, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Hoursburgh Cr Jr, Good RC. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* 1993;31:767-770

25. Salfinger M, Pfyffer GE. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13:961-979
26. Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Resp Dis* 1979;119:107-159
27. Wallace J Jr, Glassroth J, Griffith DE, Olivier KN, Cook JL, Gordin F. Diagnosis and treatment of disease caused by non-tuberculous mycobacteria. Official Statement of the American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156: S1-S25.
28. Rey R, Ausina V, Casal M, Caylà J, de March P, Moreno S et al. Situación actual de la tuberculosis en España. Una perspectiva sanitaria en precario respecto a los países desarrollados. *Med Clín (Barc)* 1995; 105:703-707
29. Euro TB and the national coordinators for tuberculosis surveillance in the WHO European Region. Surveillance of tuberculosis in Europe. Report on tuberculosis cases notified in 1998 (<http://www.cases.org/eurotb>)
30. Tacquet A et Tison F. Nouvelle technique d'isolement des mycobacteries par le lauryl-sulfate de sodium. *Ann Inst Pasteur.* 1961 ; 100 :676-680
31. Kubica GP. Differential identification of mycobacteria. *Am Rev Resp Dis* 1973;107: 9-21
32. Vestal AL. Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. U.S. Public Health Serv Publ 75-8230. Center for Disease Control. Atlanta. 1975.
33. Sommers HM, Good RC. *Mycobacterium*. In: Lennette EH, Balows Al, Hausler WJ,Jr, Shadomy HJ (eds) *Manual of Clinical Microbiology*. 4th. Ed. American Society for Microbiology 1985. Washington DC.

34. Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, Larsh HW, Lindler TH, McClatchy JK, McGinnis MR, Siddiqi SH, Wright P. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. J Clin Microbiol 1983;18:689-696
35. Laszlo A, Gill P, Handzel V, Hodgkin MM, Helbecque DM. Conventional and radiometric drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 1983;18:1335-1339
36. Brennan PJ, Heifets M, Ullom BP. Thin-layer chromatography of lipid antigens as a means of identifying nontuberculous mycobacteria. J Clin Microbiol 1982; 15: 447-455
37. Luquin M, Ausina V, López-Calahorra F, Belda F, García-Barceló M, Celma C, et al. Evaluation of practical chromatographic procedures for identification of clinical isolates of mycobacteria. J Clin Microbiol 1991;29: 2468-2472
38. Butler WR, Fost KC Jr, Kilburn JO. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. J Clin Microbiol 1991; 29: 2468-2472
39. Alcaide F, Benítez MA, Escriba JM, Martín 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
40. Truant JP, Brett WA, Thomas W Jr. Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. Henry Ford Hosp. Med Bull 1962;10:287-296

41. Saceanu CA, Pfeiffer NC, Mc Lean T. Evaluation of sputum smears concentrated by cytocentrifugation for detection of acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol* 1993;31:2371-2374.
42. Brisson-Noël A, Gicquel B, Lecossier D, Lévi-Frébault V, Nassif X, Hacen AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 1989; ii: 1069-1071
43. Clarridge JE III, Shawar RM, Shinnick TM, Plicaytis BB. Large scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2049-2056
44. Folgueira L, Delgado R, Palenque E, Noriega AR. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples by using a simple lysis method and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31:1019-1021.
45. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Naumann L. Clinical evaluation of the automated Cobas Amplicor MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2423-2429
46. Tortoli E, Lavinia F, Simonetti MT. Evaluation of a commercial ligase chain reaction kit (Abbott LCx) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2424-2426.
47. Piersimoni C, Callegaro A, Scarparo C, Penati V, Nista D, Bornigia S, Lachinni C, Scagnelli M, Santini G, De Sio G. Comparative evaluation of the new Gen-Probe *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test and the semiautomated Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3601-3604

48. Ausina V, Gamboa F, Gazapo E, Manterola JM, Lonca J, Matas L et al. Evaluation of a semiautomated Abbott LCX Mycobacterium tuberculosis Assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. J Clin Microbiol 1997; 35:1996-2000
49. Gamboa F, Domínguez J, Padilla E, Manterola JM, Gazapo E, Lonca J, Matas L, Hernández A, Cardona PJ, Ausina V. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by ligase chain reaction amplification. J Clin Microbiol 1998;36:1324-1329
50. Pfyffer GE, Kissling P, Wirth R, Weber R. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by a target-amplified test system. J Clin Microbiol 1994;32: 918- 923
51. Gamboa F, Manterola JM, Viñado B, Matas L, Giménez M, Lonca J, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in nonrespiratory specimens by Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test. J Clin Microbiol 1997; 35: 307-310
52. Gamboa F, Fernández G, Padilla E, Manterola JM, Lonca J, Cardona PJ, Matas L, Ausina V. 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: 684-689
53. Catanzaro A, et al Rapid diagnostic tests for tuberculosis. What is the appropriate use? Am J Respir Crit Care Med. 1997;155: 1804-1814
54. Manterola JM, Gamboa F, Lonca J, Matas L, Ruiz Manzano J, Rodrigo C, Ausina V. Inhibitory effect of sodium dodecil sulfate in detection of *Mycobacterium tuberculosis* by amplification of rRNA. J Clin Microbiol 1995; 33:3338-3340

55. Middleton AM, Chadwick MV, Gaya H. Evaluation of a commercial radiometric system for primary isolation of mycobacteria over a fifteen-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 166-170
56. Reisner BS, Gatson AM, Woods GL. Use of Gen-Probe AccuProbes to identify *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium gordonae* directly from BACTEC TB broth cultures. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2995-2998.
57. Padilla E, Manterola JM, González V, Lonca J, Domínguez J, Matas L, Galí N, Ausina V. Rapid detection of several mycobacterial species using a polymerase chain reaction reverse hybridization assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 661-665
58. Vannier AM, Tarrand JJ, Murray R. Mycobacterial cross contamination during radiometric culturing. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1867-1868
59. Palaci M, Mizuka SY, Sato DN, Da Silva MA, Curcio M, Matheus EA. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube for recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1996;34:762-764
60. Pfyfer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutiérrez J, Rüscherger S. 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
61. Zanetti S, Ardito F, Sanguinetti M, Molicotti P, Delogu G, Pinna MP, Nacci A, Fadda G. Evaluation of a nonradiometric system (BACTEC 9000 MB) for detection of mycobacteria in human clinical samples. *J Clin Microbiol* 1997;35: 2072-2075

62. Tortoli E, Cichero P, Chirillo MG, Gismondo MR, Bono L, Gesu G, Simonetti MT, Volpe G, Nardi G, Marone P. Multicenter comparison of ESP Culture System II with BACTEC 460 TB and with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from different clinical specimens, including blood. *J Clin Microbiol* 1998;36: 1378-1381
63. Manterola JM, Gamboa F, Padilla E, Lonca J, Matas L, Hernández A, Jiménez M, Cardona PJ, Viñado B, Ausina V. Comparison of a nonradiometric System with BACTEC 12B and culture on egg-based media for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 773-777
64. Luquin M, Gamboa F, García-Barceló M, Manterola JM, Matas L, Jiménez M, Ausina V. Comparison of a biphasic non-radiometric system with Löwenstein-Jensen and BACTEC-460 system for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Tubercle and Lung Disease* 1996; 77: 449-453
65. Kiehn TE, Cammarata R. Comparative recoveries of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* from Isolator lysis-centrifugation and BACTEC 13 A blood culture systems. *J Clin Microbiol* 1988; 26:760-761
66. Wasilauskas B, Morrell R Jr, Inhibitory effect of the Isolator blood culture system on growth of *Mycobacterium avium-M.intracellulare* in BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol* 1994;32:654-657
67. Cernoch PL, Enns RK, Saubolle MA, Wallace RJ Jr. Cumitech 16A. Laboratory diagnosis of the micobacterioses. Coordinating ed. Weissfeld AS. 1994. American Society for Microbiology. Washington D.C.
68. Minnikin DE, Hutchinson IA, Caldicott AB, Goodfellow M. Thin-layer chromatography of methanolysates of mycolic acid containing bacteria. *J Chromatogr* 1980; 188: 221-233.

69. Tisdall PA, De Young DR, Roberts GD, Anholt JP. Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas-liquid chromatography: a 10-month follow-up study. *J Clin Microbiol* 1982;16:400-402
70. Perez JJ, Fauville-Dufaux M, Dossogne JL, de Hoffman E, Pouthier F. Faster identification of mycobacteria using gas liquid and thin layer chromatography. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 717-725
71. Goto M, Oka S, Okuzumi K, Kimura S, Himada K. Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *M.avium-intracellulare* complex in culture. *J Clin Microbiol* 1992; 29:2473-2476
72. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmet T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993;31:175-178
73. Kirscher P, Springer B, Vogel U, Meier A, Wrede A, Kiekenbeck M, Bange FC, Böttger EC. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: results of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 282-2889
74. Heifets L. Qualitative and quantitative drug-susceptibility tests in mycobacteriology. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 1217-1222
75. Inderlied CB, Salfinger M. Antimicrobial agents susceptibility test: mycobacteria. *In: Murray RR, Baron EJO, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. Manual of Clinical Microbiology. Ney York. American Society for Microbiology, 1995 pp 1385-1404*

76. Wanger A, Mills K. Testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to ethambutol, isoniazid, rifampin and streptomycin by using E Test. J Clin Microbiol 1996; 34: 1672-1676
77. Woods GL, Witebsky FG. Mycobacterial testing in clinical laboratories that participate in the College of American Pathologist`s mycobacteriology E survey: results of a 1993 questionnaire. J Clin Microbiol 1995; 33: 407-412
78. Yajko DM, Madej JJ, Lancaster MV, Sanders CA, Cawthon VL, Gee B, Bast A, Hadley WK. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1995; 33: 2324-2327
79. Mshana RN, Tadesse G, Abate G, Miörner H. Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1998; 36: 1214-1219
80. Wilson SM, Al-Suwaidi Z, McNerney R, Porter J, Drobniewsky Fa. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature Medicine 1997; 3: 465-468
81. Kirk SM, Schell RF, Moore AV, Callister SM, Mazurek GH. Flow cytometric testing of susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to ethambutol, isoniazid, and rifampin in 24 hours. J Clin Microbiol 1998; 36: 1568-1573.
82. Jacobs WR Jr, Barletta Rg, Udani R, Chan J, Kalkult G, Sosne G, Kieser T, Sarkis GJ, Hatfull GF, Bloom BR. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. Science 1993; 260:819-822
83. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature. 1992, 358:591-592

84. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria; molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:496-514

85. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993; 341-350.

86. Gamboa F, Cardona PJ, Manterola JM, Lonca J, Matas L, Padilla et al. Evaluation of a comercial probe assay for detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* directly from respiratory and nonrespiratory clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:189-192.

87. Siddiqi SH, Heifets LB, Cynamon MH, Hooper NM, Lazslo A, Libonati JP, Lindholm-Levi PJ, Pearson N. Rapid broth macrodilution method for determination of MICs for *Mycobacterium avium* isolates. *J Clin Microbiol* 1993;31:2332-2338.

88. Gómez-Flores R, Gupta S, Támez-Guerra R, Mehta RT. Determination of MICs for *Mycobacterium avium- M.intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. *J Clin Microbiol* 1995;33:1842-1846

89. Telle MAS, Yates MD. Single and double drugs susceptibility testing of *M.avium* complex and mycobacteria other than the tubercle (MOTT) bacilli by a microdilution broth minimum inhibitory concentration (MIC method). *Tubercle Lung Dis* 194; 75: 286-290

90. Salfinger M, Wallace RJ Jr. Susceptibility testing for nontuberculous mycobacteria: should it be performed? *Clin Microbial Newsletter* 1997; 19:68-71

91. Brown BA, Swenson JM, Wallace RJ Jr. Broth microdilution MIC testing for rapidly growing mycobacteria. *In: Isenberg HD (ed). Clinical microbiology*

procedures handbook. American Society for Microbiology. Washington DC. 1992
pág P5,10.1-5.11.10.

92. Van Embden J, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eissenach KD, Gicquel B et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1992; 31:406-409

93. March F, Coll P, Costa R, Rodríguez P, Moreno C, Garriga M, Prats G. Utilidad de DR, PGRS y spoligotyping en el tipado de *Mycobacterium tuberculosis*. Comparación con IS 6110. Enferm Infecc Microbiol Clín 1996;14:160-166

94. Kubica CP, Gross WM, Hawkins JE, Sommers HM, Vestal AL, Wayne LG. Laboratory services for mycobacterial disease. Am Rev Resp Dis 1975; 112: 773-787

95. Haro M, Ruiz Manzano J, Gallego M, y cols. Tuberculosis pleural: análisis de 105 casos. Enferm Infecc Microbiol Clín 1996; 14: 285-289

96. Siddiqi SH, Libonati JP, Middlebrook G. Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1981;13:908-912

97. Thorton CG, Mac Lellan KM, Brink TL Jr, Lockwood DE, Romagnoli M, Turner J, Merz WG, Scwalbe RS, Moody M, Lue Y, Rossen S. Novel method for processing respiratory specimens for detection of mycobacteria by using C18-carboxypropylbetaine: blinded study. J Clin Microbiol 1998; 36:1996-2003

98. Thorton CG, Mac Lellan KM, Brink TL Jr, Passen S. In vitro comparison of NALC/NaOH, Tween 80 and C₁₈-carboxypropylbetaine for processing of specimens for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol 1998;36:3558-3566

99. Gamboa F, Manterola JM, Lonca J, Matas L, Cardona PJ, Padilla E, Viñado B, Domínguez J, Hernández A, Ausina V. Comparative evaluation of two comercial assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17: 151-157.
100. Querol JM, Mínguez J, García-Sánchez E, Farga MA, Gimeno C, García de Lomas. Rapid diagnosis of pleural tuberculosis by polymerase chain reaction. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 142: 1977-1981
101. Wiedermann B, Grimm H. Susceptibility to antibiotics: species incidence and trends. *In: Lorian V (ed): Antibiotics in laboratory medicine. Williams and Wilkins. Baltimore,MD, 1980 pp 900-1168*
102. Alados JC, Pareja L, de la Rosa M. Effect of the addition of vancomycin on the performance o fan automated nonradioactive system for detection of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17: 731-733
103. Degitz K, Steidl M, Neubert U, Plewig G, Volkenandt M. Detection of mycobacterial DNA in paraffin- embedded specimens of lupus vulgaris by polymerase- chain reaction. *Arch Dermatol Res* 1993; 285:168-170
104. Marchetti G, Gori A, Catozzi L, Vago L, Nebuloni M, Rossi MC, Esposti AD, Bandera A, Franzetti F. Evaluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin- fixed, paraffin- embedded tissues: comparison of four amplification assays. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1512-1517

6. ARTÍCULOS I-IV

ARTÍCULO I

J. M. Manterola · C. G. Thornton · E. Padilla
J. Lonca · I. Corea · E. Martínez · V. Ausina

Comparison of the Sodium Dodecyl Sulfate-Sodium Hydroxide Specimen Processing Method with the C₁₈-Carboxypropylbetaine Specimen Processing Method Using the MB/BacT Liquid Culture System

Published online: 28 January 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract The ability of physicians to diagnose tuberculosis is impacted by the use of smear and culture techniques combined with specimen processing methods. The objective of this study was to evaluate the effects of specimen processing on smear and culture sensitivity by comparing the specimen processing method that uses C₁₈-carboxypropylbetaine with the method that combines sodium dodecyl sulfate and sodium hydroxide. A total of 1,201 specimens were entered into this study. Specimens were split approximately equally such that one-half of each specimen was processed with sodium dodecyl sulfate-sodium hydroxide, while the other half was processed with C₁₈-carboxypropylbetaine. All sediments were subjected to acid-fast staining and then analyzed using the MB/BacT liquid culture system (bioMérieux, France) and solid media. The sensitivity of smear following processing with sodium dodecyl sulfate-sodium hydroxide and C₁₈-carboxypropylbetaine was 61.2% and 58.6% ($P>0.05$), respectively, while the specificities were identical (99.7%). The sensitivity of culture was 84.2% and 96.1% ($P<0.05$), respectively. The time to detection in the MB/BacT liquid culture system was 13.2±5.6 and 15.0±8.8 days ($P>0.05$), respectively, and 20.0±7.6 and 15.7±8.9 days ($P<0.05$), respectively, on

solid media. The contamination rates in the MB/BacT system were 0.8% and 8.7%, respectively, whereas the contamination rates on solid media were 2.6% and 4.3%, respectively. C₁₈-carboxypropylbetaine specimen processing was less labor-intensive than sodium dodecyl sulfate-sodium hydroxide processing and improved the ability of laboratory staff to detect the presence of mycobacteria by culture.

Introduction

The tuberculosis pandemic continues unabated. The World Health Organization estimates that by 2005 approximately 10.3 million people will become infected with *Mycobacterium tuberculosis* each year [1]. Early and accurate diagnosis remains the key to curtailing its spread. The effects of specimen processing on the ability to detect the presence of mycobacteria in clinical specimens are well documented [2, 3]. First, the buoyant nature of this class of organisms contributes to compromising the quality of clinical specimens (e.g., bacilli are poured off with the supernatant fraction following centrifugation) [4, 5]. Second, specimen processing methods may directly interfere with the diagnostic technique itself: For example, the reagents used to process clinical specimens inhibit nucleic acid amplification [6, 7, 8], and the problem of killing mycobacteria during specimen processing is well known [2]. Yajko et al. [7] report that approximately 90% of input *Mycobacterium tuberculosis* bacilli were killed in spiked samples following processing with the method recommended by the Centers for Disease Control and Prevention [2] [the N-acetyl-L-cysteine sodium hydroxide (NALC-NaOH) method].

There have been several reports describing the use of a specimen processing technique that utilizes the zwitterionic detergent C₁₈-carboxypropylbetaine (CB-18) [9, 10, 11, 12, 13]. While CB-18 specimen processing has

J. M. Manterola · E. Padilla · J. Lonca · I. Corea
E. Martínez · V. Ausina (✉)
Servicio de Microbiología,
Hospital Universitario Germans Trias i Pujol,
Carretera de Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain
e-mail: vausina@ns.hugtip.scs.es
Tel.: +34-93-4978894, Fax: +34-93-4978895

J. M. Manterola · V. Ausina
Departamento de Genética y Microbiología,
Facultad de Medicina,
Universidad Autónoma de Barcelona,
Barcelona, Spain

C. G. Thornton
Integrated Research Technology, LLC,
Baltimore, Maryland, USA

been reported to enhance smear and culture sensitivity as well as reduce the time-to-positive, this method has only been evaluated against NALC-NaOH specimen processing using the Bactec 460 TB liquid culture system (bioMérieux, France) [10]. The MB/BacT liquid culture system (bioMérieux) was introduced as an automated liquid culture system for use in the clinical laboratory. The MB/BacT system has been shown to have sensitivity equal to that of other liquid culture systems [14, 15], but the lack of radioactive waste and the aspect of automated detection provide an attractive alternative to comparative liquid culture systems.

The purpose of the present study was to compare the CB-18 specimen processing method with the specimen processing method that combines sodium dodecyl sulfate (SDS) with NaOH (SDS-NaOH) using the MB/BacT liquid culture system.

Materials and Methods

Clinical Specimens

Between March 1999 and December 1999 a total of 1,201 respiratory and nonrespiratory specimens were collected from the clinical microbiology laboratory of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona, Spain. Specimens were selected randomly for entry into this study, the only criteria being sufficient specimen volume or mass: only specimens with greater than 4 ml or 2 g were selected for processing. Upon entry into the study, specimens were split approximately equally by cutting. Respiratory specimens and other liquid specimens were separated by pouring from the specimen collection cup into two 50-ml conical centrifuge tubes. Tissue and fecal specimens were also sterilely cut and separated into two 50-ml conical centrifuge tubes. Because of the nature of clinical specimens and the difficulty associated with splitting, and, in an effort to normalize the effects of splitting on study results, that portion removed first and processed with each processing method was alternated on a daily basis.

Specimens included 836 sputa, 305 bronchial-washings, 29 tissues, and 31 other specimen types (17 exudates, 7 spermatic fluids, 4 urines, and 3 feces).

Decontamination Procedures

Two different decontamination methods were compared in this study. The specimen processing method used by the clinical microbiology laboratory of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol was a modified version of the SDS-NaOH procedure originally described by Tacquet and Tison [16]. Briefly, to the 50-ml conical tube containing 2–3 ml of the specimen were added two volumes of 1% NaOH with 3% SDS. Specimens were subjected to vortexing for 1 min and then centrifuged at 3,000×g for 20 min at 15°C. Specimens were decanted and neutralized by adding sterile 1.43% orthophosphoric acid containing 0.006% bromocresol purple until neutralization occurred. Specimens were subjected to a second centrifugation step at 3,000×g for 20 min at 15°C, decanted, and the resulting sediment subjected to acid-fast staining (see below). Prior to culture, sediments were resuspended again by the addition of 30 ml of sterile water and subjected to a third centrifugation step at 3,000×g for 20 min at 15°C. Specimens were decanted, and 1 ml of 0.067 M phosphate buffered saline (pH 6.8) was added to all sediments and the pellets resuspended. Two tubes of Löwenstein-Jensen (L-J) medium were each inoculated with 200 µl of sediment, and one MB/BacT culture vial (bioMérieux, France) supplemented with Mycobacteria Antibiotic Supplement (MAS, a commercially available mixture

of polymyxin B, azlocillin, nalidixic acid, trimethoprim, amphotericin B, and vancomycin) (bioMérieux) was inoculated with 500 µl of sediment.

The SDS-NaOH specimen processing method was compared with two different versions of CB-18 processing. The CB-18-based procedures were modified versions of that originally described [10]. In the first phase (phase 1), 10 ml of the buffered CB-18 (1 mM CB-18, 50 mM Tris-HCl, 12.5 mM citrate pH 7.6, 1.5 mM NaCl, 0.5% NALC) was initially added to specimens and this mixture subjected to vortexing at room temperature for 1 min to facilitate liquefaction of specimens. Subsequently, the same buffered CB-18 solution was added to each specimen to a final volume of 40 ml, mixed and then immediately subjected to centrifugation at 3,000×g for 20 min at 25°C. Specimens were decanted and resuspended in 1 ml of the previously described lytic enzyme resuspension buffer [11] that contained lysozyme, zymolyase, *Cytophaga* extract, and *Trichoderma* extract (LZCT) and 0.15% lecithin in 50 mM Tris-HCl, 12.5 mM citrate pH 7.6, 3 mM NaCl, 0.5% NALC. Sediments were incubated in LZCT for 20 min at 37°C. A portion of the digested sediments was subjected to acid-fast staining using fluorochromes (see below). A 200 µl portion of all processed sediments was then inoculated onto a single 7H11-selective plate (LZCT-treated specimens cannot be used to inoculate L-J media because the lytic enzyme liquefies this inspissated media [Lytic Decon product literature, Integrated Research Technology, LLC]), and a 500-µl portion was used to inoculate an MB/BacT vial supplemented with MAS.

Interim study results suggested that the concentration of CB-18 in MB/BacT culture bottles might be interfering with the sensitivity of liquid culture (a concern raised in previous reports [10, 11]). Consequently, the CB-18 procedure was modified in such a way as to ensure that the concentration of CB-18 in the MB/BacT culture bottle was as low as possible. Modifications in the second phase (phase 2) of the study were as follows: First, a 1 ml aliquot of 12.5 mM CB-18, 100 mM Tris-HCl, 25 mM citrate pH 7.6, 3 mM NaCl, and 0.5% NALC was added directly to each specimen. Specimens were thoroughly mixed and then incubated at 37°C for 30 min. After the incubation period, Tris-citrate buffer (50 mM Tris-HCl, 12.5 mM citrate pH 7.6, 1.5 mM NaCl) was added to all specimens to a final volume of 40 ml. Specimens were thoroughly mixed and then subjected to centrifugation, LZCT treatment, and analysis as described above with the exception that lecithin was omitted from the LZCT resuspension buffer (this dilution-based version of CB-18 processing was designed to ensure that the CB-18 concentration during incubation was below critical levels, thereby obviating the need for lecithin [11]).

Microscopy

Smear analysis was performed using auramine-rhodamine stains according to recommended procedures and graded as suggested by the Centers for Disease Control and Prevention [2]. All positive slides were confirmed using the Ziehl-Neelsen technique per recommended procedures [2].

Culture

The L-J slants were incubated at 35–37°C for 2 months in a humidified atmosphere and inspected twice weekly. The 7H11 plates were incubated at 35–37°C for 2 months in a 5% CO₂ atmosphere and read twice weekly under an optical microscope at 100-fold magnification. The MB/BacT bottles were incubated at 35–37°C for 2 months or until they were considered positive by the BacT/Alert incubator. After 8 weeks all MB/BacT bottles considered negative were subcultured onto an L-J slant by transferring 200 µl of culture media. These L-J slants were incubated as indicated above.

Identification of Mycobacterial Isolates

Mycobacterial isolates were identified by standard biochemical procedures [2, 3], gas-liquid and thin-layer chromatography [17] and specific DNA probes (AccuProbe; Gen-Probe, USA) [18].

Statistical Analysis

Statistical comparisons were performed using chi-squared analysis. Analyses of the time-to-positive were carried out using the two-tailed Student's *t* test.

Results

The effects of specimen processing on smear sensitivity and specificity, culture sensitivity, time-to-positive, and contamination were evaluated using split specimens. A total of 1,201 specimens were analyzed in this study. While the same SDS-NaOH procedure was used throughout this study, two different versions of the CB-18 method were evaluated. There were only several notable differences between the two different versions of CB-18 processing. These differences are highlighted where indicated.

From this group of specimens, a total of 97 (8.1%) were positive following acid-fast staining, regardless of the processing method or culture result. A total of 154 acid-fast bacteria (AFB) were isolated from 152 (12.7%) specimens by culture, regardless of the processing method or culture media (2 specimens produced multiple isolates). Respiratory specimens produced 144 AFB-positive culture results, while nonrespiratory specimens produced 8 AFB-positive culture results. Of the 154 isolates, 124 were identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex bacilli, and 30 were identified as nontuberculous mycobacteria (NTM). Evaluation of those patients from whom NTM-positive specimens were obtained suggested that all 30 NTM isolates were clinically significant (e.g., these patients were either in a high-risk group [elderly], immune compromised [AIDS], or had a prolonged respiratory infection). Included in these 30 NTM isolates were two *Nocardia asteroides* isolates and one *Tsukamurella* species isolate (since all 3 were considered clinically significant, for the purposes of discussion they were categorized with the NTM mycobacteria. The remaining NTM isolates included nine *Mycobacterium kansasii*, five *My-*

cobacterium xenopi, four *Mycobacterium chelonae*, two *Mycobacterium fortuitum*, two *Mycobacterium gordonae*, two *Mycobacterium mucogenicum*, one *Mycobacterium avium* complex, one chromogenic rapidly growing *Mycobacterium*, and one unknown *Mycobacterium*. For the purposes of brevity these NTM mycobacteria were treated as a single group in all analyses.

Of the two specimens that produced multiple isolates, the first produced *Mycobacterium xenopi* following processing by the SDS-NaOH procedure and *Tsukamurella* species following CB-18 processing. The second specimen yielded *Mycobacterium tuberculosis* following CB-18 processing and *Mycobacterium fortuitum* following SDS-NaOH processing. The former specimen was treated as NTM positive by both methods, and no distinction was made in specimen-based analyses. The latter specimen, however, was considered culture positive for *Mycobacterium tuberculosis* by the CB-18 method, but culture negative by the SDS-NaOH method, since the *Mycobacterium tuberculosis* result was considered the more clinically significant result.

Laboratory cross-contamination originating from comingling of specimens during processing was evaluated by comparing culture-positive specimens and dates of processing. Only two positive specimens could not be ruled out as having resulted from laboratory cross-contamination.

Smear Sensitivity and Specificity

Of the 97 specimens that were identified by acid-fast staining as harboring AFB, only 3 could not be associated with a positive culture result (Table 1). All three specimens were smear positive following processing by both processing methods. In two instances the specimen source was fecal material, and in the third instance the patient was on antituberculosis therapy. While the results from the feces may have been false positives, the smear result from the patient on therapy was considered legitimate. Regardless, the specificities of smear analysis following processing by SDS-NaOH and CB-18 were identical (99.7%). The increase in smear sensitivity among all culture-positive specimens ($n=152$) was 4.4% higher following SDS-NaOH processing; however, this result was not statistically significant ($P>0.05$).

Table 1 Comparison of smear results obtained by the decontamination methods

| Group | Total no. of AFB-positive specimens | No. of specimens with positive smear result | | | Smear sensitivity by processing method (%) | | |
|----------------------|-------------------------------------|---|------------|--------------|--|-------|----------------|
| | | SDS only | CB-18 only | Both methods | SDS | CB-18 | <i>P</i> value |
| All AFB | 152 | 5 | 1 | 88 | 61.2 | 58.6 | >0.05 |
| MTBC | 124 | 5 | 1 | 83 | 71.0 | 67.7 | >0.05 |
| NTM | 28 | 0 | 0 | 5 | 17.9 | 17.9 | – |
| | | | | | Smear specificity (%) | | |
| Not culture positive | 3 | 0 | 0 | 3 | 99.7 | 99.7 | – |

AFB, acid-fast bacilli; MTBC, *Mycobacterium tuberculosis* complex; NTM, nontuberculous mycobacteria; SDS, sodium dodecyl sulfate

Table 2 Evaluation of smear values and smear sensitivities by method and mycobacterial group

| | Phase 1: no incubation (n=600) | | | Phase 2: 30 min incubation (n=601) | | |
|--------------------------------------|--------------------------------|-----|------|------------------------------------|-----|-------|
| | All | NTM | MTBC | All | NTM | MTBC* |
| Identical smear values | 16 | 2 | 14 | 27 | 2 | 25 |
| CB-18 smear value >NaOH smear value | 5 | 0 | 5 | 2 | 0 | 2 |
| NaOH smear value >CB-18 smear value | 33 | 1 | 32 | 5 | 0 | 5 |
| CB-18 smear pos. and NaOH smear neg. | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| NaOH smear pos. and CB-18 smear neg. | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 1 |
| Total smear pos. | 59 | 3 | 56 | 35 | 2 | 33 |

NTM, nontuberculous mycobacteria; MTBC, *Mycobacterium tuberculosis* complex

Table 3 Comparison of culture results by decontamination method and smear result

| Group | Smear category | Total no. of cultures positive for AFB | No. of specimens with positive culture result by decontamination method ^a | | | Sensitivity of culture by processing method (%) | | |
|---------|----------------|--|--|------------|--------------|---|-------|---------|
| | | | SDS only | CB-18 only | Both methods | SDS | CB-18 | P value |
| All AFB | Positive | 94 | 0 | 0 | 94 | 100 | 100 | – |
| | Negative | 58 | 6 | 24 | 28 | 58.6 | 89.7 | <0.05 |
| | Total | 152 | 6 | 24 | 122 | 84.2 | 96.1 | <0.05 |
| MTBC | Positive | 89 | 0 | 0 | 89 | 100 | 100 | – |
| | Negative | 35 | 4 | 11 | 20 | 68.6 | 88.6 | >0.05 |
| | Total | 124 | 4 | 11 | 109 | 91.1 | 96.8 | >0.05 |
| NTM | Positive | 5 | 0 | 0 | 5 | 100 | 100 | – |
| | Negative | 23 | 2 | 13 | 8 | 43.5 | 91.3 | <0.05 |
| | Total | 28 | 2 | 13 | 13 | 53.6 | 92.9 | <0.05 |

AFB, acid-fast bacilli; MTBC, *Mycobacterium tuberculosis* complex; NTB, nontuberculous mycobacteria; SDS, sodium dodecyl sulfate

^aSubculture of negative MB/BacT culture bottles to L-J slants produced 8 culture-positive results from SDS-NaOH-processed specimens and 21 culture-positive results from CB-18-processed specimens. The SDS-NaOH-positive subcultures included 2 *Mycobacterium tuberculosis* and 6 *Mycobacterium xenopi* isolates. The CB-18-positive subcultures included 8 *Mycobacterium tuberculosis*, 11 *Mycobacterium xenopi*, and 2 *Mycobacterium kansasii* isolates. In all instances in which *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium kansasii* isolates were subcultured from the

MB/BacT bottle, the corresponding culture on solid media from the primary sediment was positive, regardless of the processing method. Of the 6 *Mycobacterium xenopi* isolates recovered from MB/BacT subcultures that had been processed by SDS-NaOH, in only 1 instance was the corresponding L-J slant positive; the other 5 subcultures were new positive results. Of the 11 *Mycobacterium xenopi* isolates recovered from MB/BacT subcultures that had been processed by CB-18, in 4 instances the corresponding 7H11 selective slant was positive; the other 7 subcultures were new positive results. Only 1 *Mycobacterium tuberculosis* and 3 *Mycobacterium xenopi* isolates were subculture positive using the CB-18 processing protocol of phase 2

Smear Values

One of the differences observed between the two different versions of CB-18 processing was seen in the resulting smear values (Table 2). In the first half of the study (i.e., phase 1), a diluted solution of CB-18 was initially added in a small volume to facilitate dispersion of the specimen. This was followed immediately with a large volume of the same solution and then subjected to centrifugation (i.e., with no incubation period). In the second half of the study, a concentrated solution of CB-18 was added in a small volume, incubated for 30 min, and then diluted prior to centrifugation. In the first half of the study, 55.9% of the smear-positive specimens had higher smear values following SDS-NaOH processing, whereas in the latter half of the study this percentage dropped to 14.3%. In phase 2 of the study, the largest group of smear-positive specimens had identical smear values (77.1%) by both processing methods. While the percentage of 4+ smear-positive specimens was not dramatically different between the first and second halves of the study

following SDS-NaOH processing, there was a marked increase in the number of 4+ smear results following CB-18 processing in the second half of the study. For example, in the first half of the study, 72.4% of the smear-positive specimens were reported as 4+ following SDS-NaOH processing, but only 21.8% of the smear-positive specimens were classified as 4+ following CB-18 processing. Alternatively, in the second half of the study, 68.6% of the smear-positive specimens were reported as 4+ following SDS-NaOH processing, and 64.7% were classified as 4+ following CB-18 processing.

Culture Sensitivity

Overall, a statistically significant increase in culture sensitivity of 14.1% was achieved when specimens were processed with CB-18. This increase was due exclusively to an increase in the isolation of AFB from smear-negative specimens (Table 3). These results were segregated to evaluate the differences in culture sensitivity relative

Table 4 Summary of time-to-positive (ttp) results for different mycobacterial groups analyzed by culture method and processing method (mean±SD)

| Group | Total no. of culture-positive specimens | Time to detection by decontamination method and culture method | | | | | | | |
|---------|---|--|-----------------|---------|-----------------|----------------|-----------------|---------|-----------------|
| | | SDS-NaOH | | | | CB-18 | | | |
| | | L-J | | MB/BacT | | 7H11 selective | | MB/BacT | |
| | | No. | Avg. ttp (days) | No. | Avg. ttp (days) | No. | Avg. ttp (days) | No. | Avg. ttp (days) |
| All AFB | 154 | 121 | 20.0±7.6 | 121 | 13.2±5.6 | 116 | 15.7±8.9 | 127 | 15.0±8.8 |
| MTBC | 124 | 109 | 19.3±5.8 | 108 | 12.8±4.8 | 100 | 15.9±8.5 | 108 | 15.3±8.3 |
| NTM | 30 | 12 | 26.2±15.7 | 13 | 16.2±9.9 | 16 | 14.9±11.3 | 19 | 13.3±11.3 |

AFB, acid-fast bacilli; L-J, Löwenstein-Jensen; MTBC, *Mycobacterium tuberculosis* complex; NTM, nontuberculous mycobacteria; SDS, sodium dodecyl sulfate

Table 5 Independent comparison of culture sensitivity values for each processing method

| Method | Smear result | Culture result ^a (n) | | | | Sensitivity (%) | | |
|----------|--------------|---------------------------------|--------------------|-------------------|------------------------|-----------------|--------------|---------|
| | | Liquid & solid media | Liquid medium only | Solid medium only | Total positive for AFB | Liquid medium | Solid medium | P value |
| SDS-NaOH | Positive | 90 | 2 | 1 | 93 | 98.9 | 97.8 | >0.05 |
| | Negative | 23 | 6 | 6 | 35 | 80.6 | 83.3 | >0.05 |
| | Total | 113 | 8 | 7 | 128 | 93.8 | 93.8 | >0.05 |
| CB-18 | Positive | 68 | 9 | 12 | 89 | 86.5 | 89.9 | >0.05 |
| | Negative | 29 | 21 | 7 | 57 | 87.7 | 63.2 | <0.05 |
| | Total | 97 | 30 | 19 | 146 | 87.0 | 79.5 | >0.05 |

AFB, acid-fast bacilli

^a Both processing methods used the MB/BacT liquid culture system, but SDS-NaOH-processed sediments were inoculated onto

L-J slants, whereas CB-18-processed sediments were inoculated onto 7H11 selective slants

to the isolation of *Mycobacterium tuberculosis* and NTM bacilli. When specimens were processed with CB-18, increases in culture sensitivity of 6.3% and 73.3% were observed among *Mycobacterium tuberculosis* and NTM isolates, respectively. The increase among NTM-positive specimens was the only difference considered statistically significant. Again, in both instances the increases in culture sensitivity were due exclusively to increases in isolation from smear-negative specimens. Evaluation of the two versions of CB-18 processing in this analysis did not offer any revelations (i.e., distribution of CB-18-positive specimens between the two phases did not generate any significant findings) with the exception of the subculture results: Subculture of negative MB/BacT culture bottles produced 8 culture-positive results from SDS-NaOH processed specimens and 21 culture-positive results from CB-18 processed specimens (see Table 3 footnote). Only 4 of the 21 CB-18-subculture-positive results were from phase 2 of the study.

Time-to-Positive

Whereas processing specimens with CB-18 increased culture sensitivity, an analysis of the unpaired time-to-positive results in the MB/BacT liquid culture system revealed that, in the aggregate (i.e., among all positive specimens), processing with SDS-NaOH reduced the av-

erage time-to-positive by 1.8 days, but this difference was not significant ($P>0.05$) (Table 4). In contrast, the average time-to-positive among *Mycobacterium tuberculosis* complex bacilli was reduced by 2.5 days ($P<0.05$) following SDS-NaOH processing, whereas the average time-to-processing among NTM bacilli was increased by 2.9 days ($P>0.05$) following SDS-NaOH processing.

The aggregate, unpaired time-to-positive results on solid media were in contrast to the results in MB/BacT: the average time-to-processing was reduced by 4.3 days ($P<0.05$) among all AFB following CB-18 processing, and reductions in the average time-to-processing of 3.4 days ($P<0.05$) and 11.3 days ($P<0.05$) were observed among *Mycobacterium tuberculosis* and NTM-positive specimens, respectively, following CB-18 processing.

Liquid versus Solid Culture Media

The culture results were further analyzed to ascertain the sensitivity of the MB/BacT system relative to the sensitivity on solid media following processing by the two different methods (L-J medium following SDS-NaOH processing, and 7H11-selective medium following CB-18 processing). In this analysis the results of each processing method were considered independently.

The sensitivity of liquid and solid media was identical following SDS-NaOH processing (Table 5); however,

Table 6 Comparison of CB-18 culture sensitivities for the two different processing phases

| CB-18 phase | Smear result | Culture result (n) | | | | Sensitivity (%) | | |
|-------------|--------------|----------------------|--------------------|-------------------|------------------------|-----------------|--------------|---------|
| | | Liquid & solid media | Liquid medium only | Solid medium only | Total positive for AFB | Liquid medium | Solid medium | P value |
| 1 | Positive | 36 | 8 | 11 ^a | 55 | 80.0 | 85.5 | >0.05 |
| | Negative | 8 | 10 | 5 | 23 | 78.3 | 56.5 | >0.05 |
| | Total | 44 | 18 | 16 | 78 | 79.5 | 76.9 | >0.05 |
| 2 | Positive | 32 | 1 | 1 ^b | 34 | 97.1 | 97.1 | >0.05 |
| | Negative | 21 | 11 | 2 | 34 | 94.1 | 67.6 | <0.05 |
| | Total | 53 | 12 | 3 | 68 | 95.6 | 82.4 | <0.05 |

AFB, acid-fast bacilli

^aOf these 11 specimens, 9 yielded *Mycobacterium tuberculosis* and 2 yielded *Mycobacterium kansasii*. Eight of these 11 were from patients on antituberculous therapy, and 9 produced a positive result upon subculturing to L-J (7 of the 9 yielded *Mycobacterium tuberculosis*, and 2 yielded *Mycobacterium kansasii*). Six of

the 8 patients diagnosed with tuberculosis and on antituberculous therapy were positive by subculturing

^bThis patient's specimen was positive for *Mycobacterium tuberculosis*; the patient was not on antituberculous therapy, and subculturing of the MB/BacT bottle produced *Candida*

the difference in sensitivity among smear-negative specimens following processing with CB-18 was significantly different: the increase in culture sensitivity of the MB/BacT system relative to the corresponding solid media result was 38.8% ($P<0.05$). The highest total number of AFB isolations in the study was achieved with the MB/BacT system following processing with CB-18 ($n=127$ [82.5% overall]); however, both SDS-NaOH and CB-18 processing resulted in the same total number of positive *Mycobacterium tuberculosis* results in the MB/BacT system (Table 4; $n=108$).

The analysis shown in Table 6 evaluated the difference in liquid versus solid media sensitivity in relation to the two different CB-18 protocols used. The occurrence of 11 specimens in phase 1 that were smear positive, but positive on solid media-only (i.e., MB/BacT negative), was the driving force behind modifying the CB-18 processing protocol and implementing phase 2 of this study. Of the 11 smear-positive MB/BacT-negative specimens in phase 1, only 1 was related to contamination. Previous reports suggested that, if the concentration of CB-18 in liquid culture was above 15–20 µg/ml, then it could interfere with the isolation of *Mycobacterium tuberculosis* [10, 11]. If 500 µl of undiluted supernatant (1 mM CB-18=383 µg/ml) were placed in an MB/BacT culture bottle with a final volume of 11 ml, then the maximum CB-18 concentration would be approximately 17 µg/ml. Any dilution of phase 1 sediments would drop the final concentration of CB-18 further (sediments that were re-suspended with 1 ml of LZCT); however, the ability to effectively dilute sediments was dependent on the nature of the specimen [11]. The dilution-based protocol of phase 2 was designed to ensure that the concentration of CB-18 would be below 5 µg/ml, regardless of the nature of the specimen. In phase 2, only one smear-positive specimen was positive on 7H11 selective media but negative in MB/BacT media (Table 6). The highest overall culture sensitivity was achieved with the MB/BacT system in phase 2, a difference that was statistically significant relative to solid media.

Culture Contamination

One of the most significant differences between the two processing methods was in culture contamination rates. In the MB/BacT liquid culture system, the contamination rate following CB-18 processing was 8.7%, compared with a rate of only 0.8% following SDS-NaOH processing. On solid media, the contamination rates were 4.3% and 2.6%, respectively, but the SDS-NaOH method used L-J slants whereas the CB-18 method used 7H11 selective plates.

Regardless, contamination did not impact culture sensitivity results. For example, among all AFB-positive specimens ($n=152$), none of the L-J slants were contaminated following SDS-NaOH processing, whereas only 1 of these 152 specimens presented with contamination in the MB/BacT culture. Similarly, among all AFB-positive specimens, only three of the 7H11 selective plates were lost to contamination following CB-18 processing, and four of the MB/BacT cultures presented with contamination; however, AFB were eventually recovered from two of these four liquid cultures.

Discussion

The goal of the present study was to evaluate the CB-18 specimen processing method for use with the MB/BacT liquid culture system. The method that had been validated in the clinical microbiology laboratory of the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol at the time of this study was the SDS-NaOH method. The results of the study reported here were consistent with previous findings [10] wherein specimen processing was shown to impact the dynamics of several diagnostic parameters. Effects were seen on smear results, culture sensitivity, time-to-positive, and contamination rates.

In contrast to a previously published study [10], there was no improvement in overall smear sensitivity following CB-18 processing. However, in that study, CB-18

processing included an incubation step and was compared with the NALC-NaOH method, and attempts to control contamination involved the use of ceftazidime, not lytic enzymes [11]. This difference in study results might be explained by the following: either (a) the lytic enzyme formulation (i.e., LZCT) interfered with smear analysis, or (b) the efficacy of CB-18 processing is time dependent. The lytic enzyme formulation used in this study has been described as increasing the background during smear analysis (Lytic Decon product literature, Integrated Research Technology, LLC). This background appears as a mesh-like particulate that complicates reading of smears. Future evaluations of the CB-18 method should provide for removal of that portion of the sediment to be analyzed by smear prior to subsequent decontamination with lytic enzymes.

The second explanation for these smear results is reflected in the shift in smear values when the incubation step was included in the second phase of this study. In the initial study describing the CB-18 procedure, an incubation step of 90 min was used prior to centrifugation: under these conditions, an increase in smear sensitivity of 58% ($P < 0.05$) was reported [10]. In the first phase of the study described herein, there was no incubation step, whereas in the second phase a 30 min incubation step was incorporated. While there was no difference in the overall smear sensitivity between these two protocols, there was clearly a shift in comparative smear values. An *in vitro* study comparing processing methods concluded that exposure of bacilli to CB-18 could be minimized to the time of the centrifugation step (i.e., no incubation step was required) [13]. However, these same authors have hypothesized that the action of CB-18 is dependent on a physiological mechanism (i.e., the active uptake of CB-18 forms lipoidal bodies, which alters the buoyant density of the bacilli) [9, 10, 11, 12, 13]. The results herein suggest that there is a minimum exposure time required to take advantage of CB-18 processing. Therefore, future use of the CB-18 protocol in processing specimens should include a longer incubation step (e.g., 90 min) to enhance recovery.

In addition to inclusion of the incubation step, another significant finding of this study is that there is a preferred CB-18 processing algorithm. In phase 1 of this study, the sensitivity of the MB/BacT system was only 80% among smear-positive specimens. Stone et al. [19] have shown that the sensitivity of the Bactec 12B liquid culture system among smear-positive specimens exceeds 99%: There were 11 smear-positive, MB/BacT-negative, and 7H11-positive specimens using the CB-18 protocol of phase 1. A previous report has shown that concentrations of CB-18 in excess of 15–20 $\mu\text{g/ml}$ in the Bactec 12B vial during incubation adversely affect the recovery of *Mycobacterium tuberculosis* [11]. In the companion report, the sensitivity of Bactec 12B liquid culture among tuberculous mycobacteria was 12.1% lower following CB-18 processing [10]. In this study, the sensitivity of MB/BacT liquid culture among tuberculous mycobacteria following CB-18 processing was 6.3% higher.

In neither instance were these results statistically significant, but the trend in the former instance was disconcerting, as was the sensitivity of MB/BacT in phase 1 among smear-positive specimens.

There are two primary differences between the Bactec 12B and the MB/BacT culture systems. The first is the media. These systems use a 7H12-based media and a supplemented 7H9-based media, respectively. The second difference is the final volume during incubation. When following recommended procedures, the final Bactec 12B volume would be 4.6 ml. The final MB/BacT volume would be 11 ml. As previously discussed, inoculating Bactec 12B bottles with undiluted sediments following processing with the CB-18 generates a final CB-18 concentration in excess of 35 $\mu\text{g/ml}$ [11]. As described above, even though CB-18-processed sediments were resuspended with LZCT, the final concentration of CB-18 in MB/BacT bottles might exceed 15 $\mu\text{g/ml}$ in some instances. Processing with the CB-18 protocol of phase 2 sets the final CB-18 concentration below 5 $\mu\text{g/ml}$. In phase 2 of this study, the sensitivity of the MB/BacT system exceeded 97% among smear-positive specimens, and there was a significant reduction in the number of subculture-positive specimens. Therefore, a dilution-based protocol is the preferred method.

The CB-18 specimen processing method was less labor-intensive than the SDS-NaOH specimen processing method, but it did not impact smear sensitivity in this study. Increasing the incubation time in the presence of CB-18 and removing aliquots before exposure to the lytic enzyme decontamination step should improve the smear sensitivity. CB-18 processing did provide a higher overall culture sensitivity. This increase was due primarily to greater recovery of NTM, but the increase in the recovery of tuberculous mycobacteria did contribute positively to the enhancement in culture sensitivity. A dilution-based protocol should further increase the recovery of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacilli. The dilution protocol described in this study calls for a small volume of buffered CB-18 (e.g., 1 ml). The ability to liquefy specimens is adversely affected by such a small volume. A modified version of the dilution protocol that provides a lower concentration of CB-18 in a larger volume (e.g., 10 ml) is currently being evaluated to examine the trade-off between liquefaction of specimens and subsequent dilution of CB-18 prior to culture. The greatest disadvantage with the CB-18-lytic enzyme procedure is the contamination rate; however, this rate was not unacceptably high, as was the case in previous studies where in ceftazidime was used in an attempt to control contamination [10].

Diagnostic procedures in mycobacteriology based on analyses of culture bring with them complications associated with contamination and, therefore, the need to process/decontaminate specimens prior to such analyses. The use of sodium hydroxide as originally reported by Petroff [20] in 1915 has changed very little in 85 years [2, 3]. The unfavorable aspects associated with culture have always been (a) the negative impacts of specimen

processing on mycobacterial viability (i.e., sensitivity), (b) lack of ease-of-use, (c) risk of high contamination rate, and (d) expense. When using a dilution-based protocol with an incubation step, the CB-18 processing method results in improved performance in each of these areas, but based on a novel hypothesis, the CB-18 method is the only procedure to compensate for the innate buoyancy of these bacteria and provide enhanced recovery during specimen processing [13]. This last advantage may be the most important, especially as it relates to the diagnosis of tuberculosis. Behr et al. [21] suggested that approximately 22% of all new cases of tuberculosis in San Francisco were the result of transmission from smear-negative patients with active disease. The greatest increase in culture sensitivity following CB-18 specimen processing was among smear-negative specimens. While this increase was due primarily to the recovery of NTM, recovery of tuberculous mycobacteria contributed positively to this outcome as well.

As it relates to nucleic acid amplification, Catanzaro et al. [22] have reviewed the clinical data submitted to the U.S. Food and Drug Administration for two commercial amplification tests for diagnosis of tuberculosis. The sensitivity of these tests among culture-positive and smear-negative specimens was approximately 50%. Improved recovery of bacilli will enhance amplification sensitivity among this group of specimens and facilitate diagnosis of infectious, smear-negative patients. A follow-up study using CB-18 processing with a polymerase chain reaction test is in progress.

References

- World Health Organization (2001) Global tuberculosis control. WHO Report 2001. Document no. WHO/CDS/TB/2001.287. WHO, Geneva, pp 18–19
- Kent PT, Kubica GP (1985) Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory. Centers for Disease Control, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, USA
- Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ Jr (1999) Mycobacterium. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds) Manual of clinical microbiology, 7th edn. American Society for Microbiology, Washington DC, pp 339–433
- Rickman TW, Moyer NP (1980) Increased sensitivity of acid-fast smears. *J Clin Microbiol* 11:618–620
- Ratnam S, March SB (1986) Effect of relative centrifugal force and centrifugation time on sedimentation of mycobacteria in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 23:582–585
- Clarridge JE III, Shawar RM, Shinnick TM, Plikaytis BB (1993) Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in a routine mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 31:2049–2056
- Yajko DM, Wagner C, Tevere VJ, Kocagöz T, Hadley WK, Chambers HF (1995) Quantitative culture of Mycobacterium tuberculosis from clinical sputum specimens and dilution endpoint of its detection by the Amplicor PCR assay. *J Clin Microbiol* 33:1944–1947
- Desjardin LE, Perkins MD, Teixeira L, Cave MD, Eisenach KD (1996) Alkaline decontamination of sputum specimens adversely affects stability of mycobacterial mRNA. *J Clin Microbiol* 34:2435–2439
- Cornejo BJ, Sahagún-Ruiz A, Suárez-Guemes F, Thornton CG, Ficht TA, Adams LG (1998) Comparison of C18-carboxy-propylbetaine and glass bead DNA extraction methods for detection of Mycobacterium bovis in bovine milk samples and analyses of samples by PCR. *Appl Environ Microbiol* 64:3099–4000
- Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL Jr, Lockwood DE, Romagnoli M, Turner J, Merz WG, Schwalbe RS, Moody M, Lue Y, Passen S (1998) Novel method for processing respiratory specimens for detection of mycobacteria by using C18-carboxypropylbetaine: blinded study. *J Clin Microbiol* 36:1996–2003
- Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL Jr, Wolfe DM, Llorin OJ, Passen S (1998) Processing respiratory specimens with C18-carboxypropylbetaine: development of a sediment resuspension buffer that contains lytic enzymes to reduce the contamination rate and lecithin to alleviate toxicity. *J Clin Microbiol* 36:2004–2013
- Thornton CG, Cranfield MR, MacLellan KM, Brink TL Jr, Strandberg JD, Carlin EA, Torrelles JB, Maslow JN, Hasson JLB, Heyl DM, Sarro SJ, Chatterjee D, Passen S (1999) Processing postmortem specimens with C18-carboxypropylbetaine and analysis by PCR to develop an antemortem test for Mycobacterium avium infections in adults. *J Zoo Wildlife Med* 30:11–24
- Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL Jr, Passen S (1998) In vitro comparison of NALC-NaOH, Tween 80 and C18-carboxypropylbetaine for processing of specimens for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 36:3558–3566
- Manterola JM, Gamboa F, Padilla E, Lonca J, Matas L, Hernández A, Giménez M, Cardona PJ, Vinado B, Ausina V (1998) Comparison of a nonradiometric system with Bactec 12B and culture on egg-based media for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17:773–777
- Brunello F, Favari F, Fontana R (1999) Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria from various clinical specimens. *J Clin Microbiol* 37:1206–1209
- Tacquet A, Tison F (1961) Nouvelle technique d'isolement des mycobactéries par le lauryl-sulfate de sodium. *Ann Inst Pasteur* 100:676–680
- Luquin M, Ausina V, López-Calahorra F, Belda F, García-Barceló M, Celma C, Prats G (1991) Evaluation of practical chromatographic procedures for identification of clinical isolates of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 29:120–130
- Goto M, Oka S, Okuzumi K, Kimura S, Shimada KY (1991) Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare complex in culture. *J Clin Microbiol* 29:2473–2476
- Stone BL, Burman WJ, Hildred MV, Jarobe EA, Reves RR, Wilson ML (1997) The diagnostic yield of acid-fast-bacillus smear-positive sputum specimens. *J Clin Microbiol* 35:1030–1031
- Petroff SA (1915) A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. *J Exp Med* 21:38–42
- Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de León A, Daley CL, Small PM (1999) Transmission of Mycobacterium tuberculosis from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 353:444–449
- Catanzaro A, Davidson BL, Fujiwara PI, Goldberger MJ, Gordin F, Salfinger M, Sbarbaro J, Schluger NW, Sierra MF, Woods GL (1997) Rapid diagnostic tests for tuberculosis. What is the appropriate use? *Am J Resp Crit Care Med* 155:1804–1814

ARTÍCULO II

J. M. Manterola · C. G. Thornton · E. Padilla ·
J. Lonca · M. Pérez · M. D. Quesada · V. Ausina

Analysis of the Contaminant Spectrum in the MB/BacT Liquid Culture System Following C₁₈-Carboxypropylbetaine Specimen Processing

Published online: 18 July 2003
© Springer-Verlag 2003

A detailed study comparing specimen processing methods for the isolation of mycobacteria was recently reported [1]. In the follow-up study presented here, 1,201 specimens (95% respiratory) were collected and split approximately equally such that one-half of each specimen was processed with 3% sodium dodecyl sulfate-1% sodium hydroxide (SDS-NaOH) [2] and the other half was processed with C₁₈-carboxypropylbetaine (CB-18) followed by lytic enzyme decontamination [3, 4]. All processed specimens were analyzed by culture using the MB/BacT liquid culture system containing the antibiotic supplement MAS (bioMérieux, France). The SDS-NaOH-processed specimens were also inoculated onto Löwenstein-Jensen slants, while the CB-18-processed specimens were also inoculated onto 7H11-selective plates (50 µg/ml carbenicillin, 200 U/ml polymyxin B, 10 µg/ml amphotericin B, and 20 µg/ml trimethoprim lactate). CB-18/lytic enzyme processing increased overall culture sensitivity by approximately 14.1% ($P < 0.05$); however, the contamination rates in the MB/BacT system following SDS-NaOH and CB-18 processing were 0.8% and 8.7%, respectively, and on solid media the contamination rates were 2.6% and 4.3%, respectively [1].

All specimens that had been processed by the CB-18/lytic enzyme method, and that were either flagged as positive in MB/BacT cultures or were observed with growth on the 7H11-selective plates, were subjected to acid-fast staining. Those culture-positive specimens that

were negative for the presence of acid-fast bacteria, or that suggested the presence of contaminating microorganisms, were further analyzed to determine the nature of the contaminant. Portions of these cultures were first subcultured onto blood agar plates. Any microorganisms that grew were then subjected to Gram staining. Contaminant speciation was performed using conventional methods [5].

A total of 105 MB/BacT cultures were considered contaminated following processing with CB-18. These 105 cultures produced 116 contaminants (Table 1): 62.1%

Table 1 Spectrum of contaminants isolated from specimens processed in the MB/BacT system with MAS or on 7H11-selective plates following CB-18 processing and lytic enzyme decontamination

| Contaminant type | No. (%) of contaminants identified | |
|---------------------------------|------------------------------------|----------------|
| | MB/BacT with MAS | 7H11-selective |
| Gram negative | | |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | 9 | 7 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 2 | 0 |
| <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> | 1 | 1 |
| <i>Morganella morganii</i> | 1 | 0 |
| <i>Serratia marcescens</i> | 4 | 1 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 0 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 1 | 1 |
| <i>Escherichia coli</i> | 1 | 0 |
| Other gram-negative rods | 2 | 3 |
| Total | 22 (19) | 13 (22.8) |
| Gram positive | | |
| <i>Streptococcus viridans</i> | 36 | 1 |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | 32 | 4 |
| Other gram-positive cocci | 1 | 0 |
| Other gram-positive rods | 3 | 4 |
| Total | 72 (62.1) | 9 (15.8) |
| Yeast (<i>Candida</i>) | 17 (14.7) | 22 (38.6) |
| Moulds (<i>Aspergillus</i>) | 4 (3.4) | 12 (21.1) |
| Unknown | 1 (0.9) | 1 (1.8) |
| Total contaminants isolated | 116 | 57 |
| Total specimens contaminated | 105 | 52 |
| Total specimens processed | 1,201 | 1,201 |
| Contamination rate (%) | 8.7 | 4.3 |

J. M. Manterola · E. Padilla · J. Lonca · M. Pérez · M. D. Quesada ·
V. Ausina (✉)

Servicio de Microbiología,
Hospital Universitario Germans Trias i Pujol,
Carretera de Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain
e-mail: vausina@ns.hugtip.scs.es
Tel.: +34-93-4978894
Fax: +34-93-4978895

J. M. Manterola · V. Ausina
Departamento de Genética y Microbiología,
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona,
Barcelona, Spain

C. G. Thornton
Integrated Research Technology, LLC, Baltimore, Maryland, USA

were gram positive, 19% were gram negative, 14.7% were yeasts, and only 3.4% were moulds. The most common species isolated were streptococci (31%) and staphylococci (27.6%). Among the 7H11-selective plates, 52 were considered contaminated following processing with CB-18. These 52 cultures produced 57 contaminants (Table 1): 38.6% were *Candida* spp., 22.8% were gram-negative bacilli, 21.1% were moulds, and 15.8% were gram positive organisms. *Candida* spp. (38.6%) and *Aspergillus* spp. (21.1%) were the most common isolates.

A comprehensive analysis of culture contamination following CB-18 processing using the BACTEC 12B culture system was reported previously by Thornton et al. [4]. Their analysis of the contaminants breaking through BACTEC 12B cultures containing the antibiotic supplement PANTA (Becton-Dickinson, USA) revealed a spectrum of 84.2% gram negative, 8.8% gram positive, and 7.1% fungal organisms [4]. Based on these results, obtained using respiratory specimens from the general microbiology laboratory, fortification of PANTA with ceftazidime (PANTA-*caz*) at 8 µg/ml was expected to control contamination [4]. However, when respiratory specimens from AFB laboratories were processed with CB-18 and inoculated into BACTEC 12B-PANTA-*caz* cultures in a large study [3], the spectrum of breakthrough-contaminants changed: 38.2% gram negative, 20.1% gram positive, and 40.9% fungal [4]. Subsequent development of the lytic enzyme resuspension buffer containing lysozyme, zymolyase, *Trichoderma* extract, and *Cytophaga* extract (i.e., LZCT) seemed to control contamination without affecting culture sensitivity [4].

The results of our study represent the first description of the spectrum of breakthrough-contaminants found in the MB/BacT-MAS culture system following CB-18/lytic enzyme processing. In general, these results are not dissimilar to those reported by other authors. For example, contamination rates of 6.7% and 2.7% were reported in the absence and presence of vancomycin, respectively [6], and contamination rates of 4.6% and 7.1% were observed following processing with 1.5% and 1% sodium hydroxide, respectively [7]. The highest contamination rate reported previously was 25% [8]. In all of these prior studies, gram-positive bacteria comprised the predominant contaminant.

The final concentration of antibiotics provided by MAS includes polymyxin B (50 U/ml), azlocillin (1.5 µg/ml), nalidixic acid (18 µg/ml), trimethoprim (0.5 µg/ml), amphotericin B (8 µg/ml), and vancomycin (0.2 µg/ml). The utilization of vancomycin in MAS would have been expected to control gram-positive contamination [6]. Therefore, either the gram-positive contaminants were resistant to vancomycin at 0.2 µg/ml, or CB-18 and/or the lytic enzymes interfered with the efficacy of vancomycin. Previous experiments examining the effects of CB-18, lytic enzymes and vancomycin on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (ATCC 43015) suggest no such effect [9]. Thus, it seems more likely that the concentration of vancomycin is too low to be effective, since the

cut-off for vancomycin resistance among *Streptococcus* and *Staphylococcus* spp. is considered to be 5 µg/ml [10].

A previous summary of gram-positive bacteria evaluated for susceptibility to vancomycin revealed that only 2 of 227 isolates tested were susceptible to vancomycin at 0.25 µg/ml [10]. Inclusion of vancomycin at either 1 µg/ml [6] or 10 µg/ml [11] does not appear to affect the isolation rate or the time-to-positive rate of tuberculous mycobacteria, but it may affect the isolation of non-tuberculous mycobacteria [7]. Perhaps a higher concentration of vancomycin in MAS could be used in those laboratories where isolation of tuberculous mycobacteria is predominant.

References

1. Manterola JM, Thornton CG, Padilla E, Lonca J, Corea I, Martínez E, Ausina V (2003) Comparison of the sodium dodecyl sulfate-sodium hydroxide specimen processing method with the C₁₈-carboxypropylbetaine specimen processing method using the MB/BacT liquid culture system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22:35–42
2. Tacquet A, Tison F (1961) Nouvelle technique d'isolement des mycobactéries par le lauryl-sulfate de sodium. *Ann Inst Pasteur* 100:676–680
3. Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL Jr, Lockwood DE, Romagnoli M, Turner J, Merz WG, Schwalbe RS, Moody M, Lue Y, Passen S (1998) Novel method for processing respiratory specimens for detection of mycobacteria by using C₁₈-carboxypropylbetaine: blinded study. *J Clin Microbiol* 36:1996–2003
4. Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL Jr, Wolfe DM, Llorin OJ, Passen S (1998) Processing respiratory specimens with C₁₈-carboxypropylbetaine: development of a sediment resuspension buffer that contains lytic enzymes to reduce the contamination rate and lecithin to alleviate toxicity. *J Clin Microbiol* 36:2004–2013
5. Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ Jr (1999) Mycobacterium. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover FC, Tenover FC (eds) *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 399–437
6. Alados JC, Pareja L, Rosa M de la (1998) Effect of the addition of vancomycin on the performance of an automated nonradioactive system for detection of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17:731–733
7. Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A, Tosi CP, Nista D, Bornigia S, Scagnelli M, Rigon A, Ruggiero G, Goglio A (2001) Comparison of MB/BacT ALERT 3D system with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. *J Clin Microbiol* 39:651–657
8. Whyte T, Hanahoe B, Collins T, Corbett-Feeney G, Cormican M (2000) Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and MB BAC/T systems for routine detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 38:3131–3132
9. Thornton CG, MacLellan KM, Stabel JR, Carothers C, Whitlock RH, Passen S (2002) Application of the C₁₈-carboxypropylbetaine specimen processing method to recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from ruminant tissue specimens. *J Clin Microbiol* 40:1783–1790
10. Wiedemann B, Grimm H (1996) Susceptibility to antibiotics: species incidence and trends. In: Lorian V (ed) *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 900–1168
11. Chang CL, Park TS, Oh SH, Kim HH, Lee EY, Son HC, Kim CM (2002) Reduction of contamination of mycobacterial growth indicator tubes with a modified antimicrobial combination. *J Clin Microbiol* 40:3845–3847

ARTÍCULO III

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Paraffin-Embedded Pleural Biopsy Specimens by Commercial Ribosomal RNA and DNA Amplification Kits*

Juan Ruiz-Manzano, MD; Joxe-Mari Manterola; Fredy Gamboa, PhD; Ana Calatrava, MD; Eduardo Monsó, MD; Carlos Martínez, MD; and Vicente Ausina, MD

Study objectives: To evaluate the utility of two gene amplification systems in historical paraffin-embedded pleural biopsy (PEB) tissues from patients with pleural tuberculosis, and to compare the results to those obtained with conventional histologic and microbiological methods.

Design: A retrospective study.

Patients and methods: Seventy-four formalin-fixed PEB tissues collected and stored over 12 years (1984 through 1995) were retrieved. Gene amplifications were performed in 57 tissues from patients with diagnoses of pleural tuberculosis and in 17 from patients with carcinoma as controls, using the first version of the Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (AMTDT; Gen-Probe; San Diego, CA) and the LCx *Mycobacterium tuberculosis* Assay (LCxMTB; Abbott Laboratories; Abbott Park, IL).

Results: The sensitivities of the AMTDT and LCxMTB were 52.6% and 63.2%, respectively ($p =$ not statistically significant). The specificity of both tests was 100%. Twenty tissue samples (35.1%) were positive by both systems, and 10 tissues (17.5%) were positive only by the AMTDT, while 16 tissues (28.1%) were positive only by the LCxMTB. Both tests gave negative results for 11 specimens (19.3%). When both tests were used, a positive diagnosis was achieved in 80.7% of the samples. Diagnosis of 73.7% of patient conditions had previously been made by smear examination of pleural biopsy and sputum, pleural liquid, or biopsy culture. The overall diagnostic yield with both culture and amplification techniques was 96.5% (55 of 57 patients) for pleural tuberculosis, with amplification techniques adding 22.8% of the diagnoses.

Conclusions: Amplification techniques are useful in archival PEB tissues, providing additional diagnoses beyond culturing, although the sensitivity should be improved, possibly by standardizing protocols. (CHEST 2000; 118:648–655)

Key words: gene amplification; paraffin-embedded pleural tissue; pleural tuberculosis

Abbreviations: AMTDT = Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test; LCxMTB = LCx *Mycobacterium tuberculosis* Assay; PCR = polymerase chain reaction; PEB = paraffin-embedded pleural biopsy; RLU = relative light unit

The diagnosis of pleural tuberculosis—the second most frequent clinical presentation of human tuberculosis—is usually based on the observation of necrotizing granulomas in pleural biopsy tissue.¹

*From the Departments of Pneumology (Drs. Ruiz-Manzano, Monsó, and Martínez), Microbiology (Mr. Manterola, and Drs. Gamboa and Ausina), and Pathology (Dr. Calatrava), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain. Manuscript received September 28, 1999; revision accepted March 28, 2000.

Correspondence to: Juan Ruiz-Manzano, MD, Pneumology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera del Canyet s/n, 08916, Badalona, Barcelona, Spain; e-mail: jruiz@ns.hugtip.scs.es

Biochemical analysis for adenosine deaminase, lysozyme, and interferon- γ can contribute to diagnosis and, in some cases, render pleural biopsy unnecessary.^{1–4} Acid-fast staining of pleural fluid is a rapid, inexpensive method for diagnosing pleural tuberculosis, but sensitivity is low. The isolation of *Mycobacterium tuberculosis* in cultured pleural fluid or tissue biopsy specimens permits firm diagnosis, but, again, sensitivity is low and results can take as long as 3 to 6 weeks to arrive.

Various gene amplification techniques have demonstrated their utility in the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary forms of tuberculosis.^{5–8} These

techniques, which have usually involved homemade polymerase chain reaction (PCR) in pleural fluid samples,⁹⁻¹¹ rather than commercially available kits, have performed poorly in the diagnosis of pleural tuberculosis. The aim of the present study was to evaluate the sensitivity and specificity of two commercial techniques of gene amplification for the diagnosis of pleural tuberculosis from formalin-fixed paraffin-embedded pleural biopsy (PEB) tissues, and to compare them with diagnostic results from pleural liquid and biopsy stains and cultures. We chose to study PEB tissues because few such "sterile" fluid specimens yield positive findings yearly. By retrieving stored samples, we were able to obtain a total of 57 tuberculous samples, our assumption being that the results obtained probably underestimate those achievable with fresh samples.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Clinical Specimens

From the archives of the Pathology Department of our hospital, we obtained sections of 74 blocks of 10% neutral buffered formalin-fixed PEB material corresponding to 74 patients. The tissue blocks were collected between 1984 and 1995, and were processed by standard procedures in the same laboratory. The sections were stained using the Ziehl-Neelsen technique for microscopic examination.

Fifty-seven patients, with 57 specimens, were given a diagnosis of pleural tuberculosis based on the following criteria: (1) isolation of *M tuberculosis* in sputum, pleural fluid, or biopsy specimen from patients with granulomas in pleural tissue (38 patients); (2) positive culture of *M tuberculosis* in the pleural biopsy specimen without granulomas (1 patient); and (3) patients whose diagnosis was based on the presence of necrotizing granulomas and the following criteria: lymphocytic liquid, positive purified protein derivative and adenosine deaminase activity > 40 IU/L (16 cases), or alternatively, on clinical and biochemical criteria exclusively; lymphocytic liquid, positive purified protein derivative and adenosine deaminase activity > 40 IU/L, in 2 young patients with recent contact with Ziehl-Neelsen-positive tuberculosis. Seventeen negative tissue controls were included, all of which were sections of pleural biopsy in patients with malignancy.

For 39 of the 57 patients with pleural tuberculosis, we also had records of the results of cultures of fresh pleural biopsy samples. They had been homogenized with 1 mL of sterile water and processed for microscopic examination using auramine-rhodamine and Ziehl-Neelsen stain techniques. Five hundred microliters of the homogenized sample was inoculated onto two tubes of Löwenstein-Jensen solid media and incubated at 37°C for up to 8 weeks. Pleural fluids from 41 patients were inoculated into the same culture media after centrifugation at 3,000g for 20 min. Other respiratory specimens, such as sputum from 18 patients, were processed for culture after decontamination by Tacquet-Tison technique on arrival in the laboratory.¹² Mycobacteria were identified by routine biochemical methods and Accuprobe culture confirmation tests (Gen-Probe; San Diego, CA).¹³

RNA and DNA Extraction From PEB Tissues

Two 10- μ m sections of each PEB sample were separately placed in two 1.5-mL Eppendorf tubes. The microtome blade was changed after each sample was sectioned to avoid cross-contamination. Each sample was deparaffinized by adding 1 mL of xylene, mixing on a rotary platform for 30 min at room temperature, and then discarding the supernatant after 8 min of centrifugation at 13,000g. This process was repeated twice for each sample. The remaining xylene was then extracted by adding 1 mL of absolute ethanol to each sample and vortexing for 30 s. The mixture was pelleted by centrifugation at 13,000g for 8 min and the ethanol removed. The xylene extraction procedure was repeated. Two drops of acetone were then added, and the tubes were incubated open in a water bath for 15 min at 60°C. The dried samples were resuspended in 100 μ L of digestion buffer (2 mM Tris-HCl [pH 8.5], 0.06 mM ethylenediaminetetraacetate, and 0.005% sodium dodecyl-hydrogene sulfate) containing 500 μ g/mL of proteinase K. Digestion took place at 55°C for 3 h. The preparations were vortexed for 30 s and then incubated at 95°C for 10 min to enhance mycobacterial lysis and inactivate the proteinase K. Then, the samples were spun for 2 min to pellet nonsoluble debris for removal. The supernatant was used without further purification. Further mycobacterial cell lysis was induced with sonication according to Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (AMTDT; Gen-Probe) and LCx *Mycobacterium tuberculosis* Assay (LCxMTB; Abbott Laboratories; Chicago, IL) protocols.¹⁴

AMTDT Protocol

The AMTDT kit uses an isothermal enzymatic amplification system of target ribosomal RNA, with the target amplicons detected using a chemiluminescent acridinium ester-labeled DNA probe. The test was performed in three steps according to the instructions on the package insert of the first version of the kit. Briefly, lysis was induced by adding 50 μ L of digested sample to 200 μ L of specimen dilution buffer in a lysing tube, and the mixture was sonicated in a Branson 1200 water bath sonicator (Branson Ultrasonics; Danbury, CT) for 15 min at room temperature. For amplification, 25 μ L of reconstituted amplification reagent was placed in the bottom of a reaction tube and covered with 200 μ L of mineral oil. Fifty microliters of lysate was transferred to the amplification tube, incubated at 95°C for 15 min, and then cooled at 42°C for 5 min. After addition of an enzyme reagent mix (25 μ L), the mixture was incubated at 42°C for 2 h. Twenty microliters of the termination reagent was added to each amplification tube, and the mixtures were kept at 42°C for another 10 min. Detection was achieved by adding 100 μ L of the reconstituted acridinium-labeled probe reagent to each tube and incubating the mixtures at 60°C for 15 min. The selection reagent (300 μ L) was then added, and the mixture was reincubated at 60°C for 10 min. All temperature-controlled incubation steps were carried out in heating blocks, and all runs included AMTDT positive and negative amplification controls and positive and negative hybridization controls. The tubes were cooled at room temperature for 5 to 10 min prior to being read in a luminometer (Leader 50; Gen-Probe) with the cutoff value set at 30,000 relative light units (RLUs). Thus, samples showing > 30,000 RLUs were considered positive, and those showing < 30,000 RLUs were considered negative.

LCxMTB

One hundred microliters of each deparaffinized and digested specimen was placed in an LCxMTB kit respiratory specimen tube and centrifuged at 1,500g for 10 min. The supernatant was

aspirated, and 1 mL of respiratory specimen resuspension buffer from the kit was added to the tube, which was centrifuged once again at 1,500g for 10 min. The supernatant was removed, and 0.5 mL of LCxMTB respiratory specimen resuspension buffer was pipetted into the specimen tube, after which the suspension was vortexed and placed in an LCxMTB covered dry bath for 20 min at 95°C. Finally, mycobacterial DNA was released by mechanical lysis in the LCxMTB lysor for 10 min. For amplification, 100 µL of the lysed specimen was added to the appropriately labeled LCxMTB tuberculosis amplification vial containing 100 µL of the reaction mixture of the ligase chain reaction, which contained thermostable DNA ligase and DNA polymerase, deoxyribonucleoside triphosphate, and four oligonucleotide probes labeled with haptens. Two calibrators and two negative controls were included in each test run. The specimens and controls were placed in the LCxMTB thermal cycler and amplified for 37 cycles of incubation for 1 s at 94°C, 1 s at 55°C, and 40 s at 69°C. For detection, the amplification vials were removed from the thermal cycler, transferred to the reaction cell in the carousel of the kit, and then locked into the LCxMTB analyzer. Each oligonucleotide probe has either a capture hapten or a detection hapten, each at a different end of the amplification product. In the analyzer, a sample of the amplification product is automatically transferred to an incubation well, where the microparticles coated with anticapture hapten bind the amplification product. The reaction mixture is then automatically transferred to a glass fiber matrix to which the microparticle complexes bind irreversibly. Washing removes the unligated probe, which has only the detection hapten. The bound microparticle complexes are then incubated with antidetection hapten alkaline phosphatase conjugate, which binds to the detection haptens. The antibody conjugate is then detected by addition of the substrate, 4-methylumbelliferyl phosphate, which is dephosphorylated by alkaline phosphatase, producing 4-methylumbelliferone, a fluorescent molecule that is measured by the optical assembly. A ratio of sample value to cutoff value > 1.0 indicates a positive result.

Statistical Analysis

Sensitivity values were compared using a McNemar test for comparison of percentages for paired data. A binomial test was used when the sample size was very small.

RESULTS

The AMTDT was positive in 30 of 57 PEB blocks that were positive for tuberculous disease by microbiological and/or clinical and histopathologic criteria (Table 1). The AMTDT was negative in all 17 PEB blocks with clinical and histologic diagnoses of carcinoma. Thus, sensitivity and specificity were 52.6% and 100%, respectively, for the AMTDT (Table 2). The LCxMTB was positive in 36 of 57 PEB blocks that were positive for tuberculous disease (Table 1). None of the 17 carcinoma controls had positive LCxMTB results. Therefore, sensitivity and specificity were 63.2% and 100%, respectively, for the LCxMTB (Table 2). Table 2 also shows the values for sensitivity of both kits according to the means by which diagnosis was obtained. Differences were not statistically significant.

Amplification was positive for a total of 20 samples

(35.1%) in both systems, for 10 samples (17.5%) only in the AMTDT, and for 16 samples (28.1%) only in the LCxMTB; 11 samples (19.3%) were negative in both tests. At least one of the two amplification techniques was positive in 46 of the 57 tuberculous PEB tissues analyzed (80.7%).

Colonies of *M tuberculosis* had been isolated in the sputum cultures of 11 of 18 patients (61.1%), in 25 of 41 patients (61.0%) with pleural fluid samples, and in 28 of 39 patients (71.8%) whose pleural biopsy specimens had been cultured. Using either microscopic examination or culture of sputum, pleural fluid, or pleural biopsy, a pleural tuberculosis diagnosis was established in 42 patients (73.7%). By adding to these patients those confirmed by one or the other of the amplification techniques, a sure etiologic diagnosis was achieved in 55 of 57 patients (96.5%). Individually, AMTDT increased diagnosis by 14% (eight more cases), such that total diagnosis of AMTDT plus culture would reach 87.7%. LCxMTB increased diagnosis by 15.8% (nine more cases), such that diagnosis of LCxMTB plus culture would reach 89.5%. Amplification techniques, thus, contributed an additional 22.8% of the etiologically confirmed diagnoses.

DISCUSSION

The rapid detection of *M tuberculosis* by PCR or other gene amplification techniques may eventually become the standard laboratory method for diagnosing tuberculosis, as such techniques allow mycobacterial nucleic acid sequences to be multiplied sufficiently to permit earlier detection of the tuberculous bacillus. To date, several DNA or RNA amplification kits have been marketed and studied. The AMTDT and LCxMTB systems have been extensively evaluated in respiratory samples, in which they have been found highly sensitive and specific. Their utility in paucibacillary forms of tuberculosis or normally sterile fluids, such as pleural, articular, and cerebrospinal fluids, or in any PEB specimen, is still unknown. As few such specimens yield positive findings in any given year in our practice, we evaluated the AMTDT and LCxMTB amplification kits in PEB samples in storage at our laboratory in order to obtain a total of 57 tuberculous samples for study.

The AMTDT and LCxMTB kits gave sensitivity values of 52.6% and 62.3%, respectively, in PEB samples. These percentages rose to 61% and 69%, respectively, in PEB samples with positive Ziehl-Neelsen smears. The amplification of ribosomal RNA, as in the AMTDT, is theoretically more sensitive than DNA amplification, because approximately 2,000 copies are made per-cell rather than

Table 1—Comparison of Results Obtained in PEB Specimens by Culture, Histologic Study, and Two Genetic Amplification Techniques*

| Specimens | Culture Results for <i>M tuberculosis</i> | | | Histologic Study | | Amplification Results | |
|--|---|-----|-----|------------------|-----|-----------------------|--------|
| | SP | PF | PB | GR | ZN | AMTDT | LCxMTB |
| Culture negative | | | | | | | |
| 1 | ND | Neg | ND | Neg | Neg | Pos | Neg |
| 2 | ND | Neg | ND | Neg | Neg | Neg | Neg |
| 3 | ND | ND | ND | Pos | Neg | Neg | Neg |
| 4, 5 | ND | ND | ND | Pos | Neg | Pos | Neg |
| 6 | ND | Neg | ND | Pos | Neg | Pos | Neg |
| 7 | ND | ND | ND | Pos | Neg | Neg | Pos |
| 8, 9 | ND | Neg | ND | Pos | Neg | Neg | Pos |
| 10, 11 | ND | Neg | Neg | Pos | Neg | Neg | Pos |
| 12, 13 | ND | Neg | Neg | Pos | Neg | Pos | Pos |
| 14, 15 | ND | ND | ND | Pos | Neg | Pos | Pos |
| Sputum or pleural fluid culture positive | | | | | | | |
| 16 | Pos | ND | ND | Pos | Neg | Neg | Neg |
| 17 | Neg | Pos | ND | Pos | Neg | Neg | Neg |
| 18, 19 | Neg | Pos | Neg | Pos | Neg | Neg | Neg |
| 20 | ND | Pos | Neg | Pos | Neg | Neg | Pos |
| 21 | Pos | Pos | Neg | Pos | Neg | Neg | Pos |
| 22, 23 | ND | Pos | ND | Pos | Neg | Pos | Pos |
| 24 | Neg | Pos | Neg | Pos | Neg | Pos | Pos |
| Pleural biopsy culture positive | | | | | | | |
| 25 | ND | Pos | Pos | Pos | Neg | Neg | Neg |
| 26 | Neg | Pos | Pos | Pos | Neg | Neg | Neg |
| 27 | ND | ND | Pos | Pos | Neg | Neg | Neg |
| 28 | ND | Pos | Pos | Pos | Neg | Pos | Neg |
| 29 | ND | ND | Pos | Pos | Neg | Neg | Pos |
| 30 | Neg | Pos | Pos | Neg | Neg | Pos | Neg |
| 31 | ND | ND | Pos | Pos | Neg | Pos | Neg |
| 32 | Pos | Pos | Pos | Pos | Neg | Pos | Neg |
| 33 | ND | Neg | Pos | Pos | Neg | Neg | Pos |
| 34 | Pos | Pos | Pos | Pos | Neg | Neg | Pos |
| 35 | Neg | Neg | Pos | Pos | Neg | Neg | Pos |
| 36, 37 | ND | Pos | Pos | Pos | Neg | Neg | Pos |
| 38–40 | ND | ND | Pos | Pos | Neg | Pos | Pos |
| 41 | Pos | ND | Pos | Pos | Neg | Pos | Pos |
| 42 | ND | Pos | Pos | Pos | Neg | Pos | Pos |
| 43, 44 | Pos | Pos | Pos | Pos | Neg | Pos | Pos |
| Pleural biopsy ZN positive | | | | | | | |
| 45 | ND | ND | ND | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 46 | ND | ND | ND | Pos | Pos | Pos | Neg |
| 47 | ND | Neg | Neg | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 48 | Pos | Neg | ND | Pos | Pos | Neg | Neg |
| 49 | Pos | Pos | Neg | Pos | Pos | Neg | Pos |
| 50 | ND | Pos | Pos | Pos | Pos | Neg | Neg |
| 51 | ND | Pos | Pos | Pos | Pos | Neg | Pos |
| 52 | Pos | Neg | Pos | Pos | Pos | Neg | Neg |
| 53 | ND | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 54 | ND | Neg | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 55 | ND | Neg | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 56 | ND | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 57 | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos | Pos |
| 58–74 | ND | ND | ND | Carcinoma | Neg | Neg | Neg |

*SP = sputum; PF = pleural fluid; PB = pleural biopsy; GR = granuloma; ZN = Ziehl-Neelsen stain; Pos = positive; Neg = negative; ND = not done.

per-target sequence, but in our study, the LCxMTB gave slightly better results than did the AMTDT. The level of sensitivity in our PEB samples was lower than those reported by other authors for respiratory and extrapulmonary samples. The AMTDT has dem-

onstrated excellent sensitivity (70 to 89%) and specificity (95 to 100%) in numerous assays with respiratory^{5,7,15–21} and extrapulmonary samples.^{8,21–23} Assessment of the LCxMTB in respiratory specimens has shown that sensitivity ranges from 96.7 to

Table 2—Sensitivity of AMTDT and LCxMTB M tuberculosis in PEB Samples*

| Diagnostic Methods | Patients, No. | % of Sensitivity, 95% Confidence Interval | | p Value |
|--|---------------|---|-------------|---------|
| | | AMTDT | LCxMTB | |
| Culture negative | 15 | 53 | 60 | |
| Sputum or pleural fluid culture positive | 9 | 33 | 56 | |
| Pleural fluid culture positive | 20 | 55 | 65 | |
| Pleural biopsy specimen ZN positive | 13 | 61 | 69 | |
| All patients (mean ± SD) | 57 | 52.6 ± 12.9 | 63.2 ± 12.5 | NS |

*Data are presented as % unless otherwise indicated. NS = not statistically significant; see Table 1 legend for abbreviation.

100% in smear-positive specimens, from 36.8 to 85.7% in smear-negative specimens, and from 77 to 100% in specimens overall.^{24–27} In extrapulmonary tuberculosis, the sensitivities of the LCxMTB are 100% and 71% for smear-positive and smear-negative specimens, respectively, and between 73.3% and 78.5% for all specimens.^{26,28} The differences between our sensitivity data and those obtained by the cited authors are not surprising, however, given that we dealt with samples containing far fewer bacilli. The 100% specificity of AMTDT and LCxMTB in our PEB samples, in other hand, agrees with the high specificities reported in all cited publications.

Our results, like those of other authors who have worked with paucibacillary specimens, thus show that gene amplification techniques give relatively low yield in such specimens. In paraffin-embedded skin specimens from patients with a diagnosis of lupus vulgaris, Degitz et al²⁹ found *M tuberculosis* DNA in 53.3% (8 of 15) by PCR, similar to our results in pleural tissues and to results in skin cultures. Moreover, they reported four PCR-positive findings (66.7%) in six papulonecrotic tuberculid samples.³⁰ Other authors³¹ detected *M tuberculosis* DNA in seven of nine paraffin-embedded samples (77.8%) of papulonecrotic tuberculid. Marchetti et al,³² working with four nested PCR assays in 37 autopsy samples from HIV-positive patients, demonstrated that the sensitivity of PCR depends on the DNA concentration used for amplification, on target DNA size, or on the number of target sequences present in the *M tuberculosis* gene, with PCR sensitivity ranging from 47 to 87%. Similarly, *Mycobacterium leprae* was detectable by PCR amplification in 87.1% of biopsy specimens from multibacillary patients and in 36.4% of biopsy specimens from paucibacillary patients.³³ Results in fresh pleural samples are similar. Vla-

spolder et al,²¹ from 61 pleural exudate specimens, reported 20% sensitivity with the AMTDT (one transcriptase-mediated amplification positive out of five culture positives). Other authors, from 65 pleural fluids analyzed, obtained a level of sensitivity of PCR that was similar to that of mycobacterial culture.²² Other normally sterile fluids, such as pericardial or cerebrospinal fluids, are also paucibacillary, and the sensitivity of culture and amplification techniques in them is still low. In tuberculous pericarditis, Cegielski et al,³⁴ using a homemade PCR process, reported a high sensitivity (80%) with 15 fresh pericardial tissues but very poor results (15%) with 13 pericardial fluid specimens; those results were similar to findings by Vlasplolder et al²¹ for pleural fluids. Bonington et al,³⁵ on the other hand, managed an overall sensitivity of 25% (10 of 40 patients) in tuberculous meningitis with the Amplicor PCR system (Roche Molecular Systems; Branchburg, NJ).

We have found a few reports of high PCR sensitivities in paucibacillary samples, however. Palacios et al,³⁶ working with 186 pleural exudates, found the LCxMTB system to be more sensitive (16 positive) than solid or liquid culture (12 positive). Querol et al,⁹ studying 21 patients with tuberculous pleurisy, found the sensitivity of a homemade PCR of pleural fluid to be 81%, making it more sensitive than microscopic examination, pleural fluid culture (52%), or biopsy culture (67%), those culture results being similar to ours.⁴ Folgueira et al,¹⁰ working with 20 patients with smear-negative tuberculous pleuritis, achieved a sensitivity of 85% with pleural fluid culture and 100% sensitivity with a homemade PCR process using undiluted and 10-fold diluted lysates in order to reduce the number of PCR inhibitors. In that study, lysis accomplished by nonionic detergent and proteinase K proved more effective than sonication for releasing DNA from mycobacteria. Other researchers, using a nested PCR and restriction enzyme analysis of the PCR amplicons, found the technique useful for the detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium–M avium–intracellulare complex* in animal paraffin-embedded tissues.³⁷

Less than optimal sensitivity in amplification techniques in pleural specimens, when taken in conjunction with numerous reports of false-positives due to contamination with DNA fragments (amplicons) from previous amplification techniques, leads us to consider whether results might be improved by standardizing protocols. In an international quality control study, only 5 of 30 laboratories correctly identified the presence or absence of mycobacterial DNA³⁸; similarly, another comparison study reported false-positive PCR results ranging from 3 to 20%. Results from one laboratory in the study were

false-positives in 77% of samples.³⁹ To reduce the likelihood of false-positives in our study, the microtome blade was changed after sectioning each sample to avoid cross-contamination. AMTDT and LCxMTB, unlike the Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PCR test and Cobas Amplicor *M tuberculosis*, which use uracil-DNA-glycosylase, have no system for neutralizing contamination by amplicons. We therefore used negative controls in all runs, finding no false-positives in the 17 carcinoma samples. As mentioned, the sensitivity of nucleic amplification techniques depends on the number of mycobacteria, their homogenous distribution in the sample, and the presence of amplification inhibitors in the analyzed sample.⁴⁰ Our relatively low sensitivities of 52.6% and 63.2% in AMTDT and LCxMTB, respectively, could therefore be due to inhibitors in PEB tissues, to destruction of DNA and RNA in PEB blocks stored for many years in the laboratory,²⁹ or to limited sensitivity of the commercial kits. When assessing the overall utility of these tests, however, it is important to remember that we were able to detect *M tuberculosis* in > 80% of the pleural PEB specimens with one technique or the other or both, although in 45.6%, one or the other technique was negative. The stated minimum number of bacilli in the samples for detection to occur is 10 cfu,⁵ although nine bacilli in a 5- μ m section of mouse tissue were detected after up to 7 days of fixation in 10% neutral buffered formalin.⁴¹ Kirschner et al⁴² showed that inhibitors of amplification were found in 11.5% of biopsy specimens and in 25% of pleural fluids. Thus, strategies to improve the amplification sensitivity in PEB tissues include the following: (1) improving fixation procedures, among which it seems that 10% neutral buffered formalin is perhaps the best fixative^{29,41}; (2) improving lysis and enzymatic method with proteinase K, which seems better than boiling or sonication^{9,37}; (3) using 500 μ L rather than 50 μ L of decontaminated sediment to amplify in the AMTDT,⁴³ or reducing the resuspension of buffer volume in the LCxMTB³⁶; (4) inactivating polymerase inhibitors by the guanidinium isothiocyanate method,^{26,44,45} by phenol-chloroform and ice-cold ethanol,^{31,32} or by using capture resin⁴⁶; (5) choosing the best primers, which are those that amplify short DNA sequences³²; and (6) increasing the number of amplification cycles³⁶ or doing nested PCR with a second amplification using internal primers.⁴⁷ Finally, although sensitivity and specificity remain the main improvement targets for amplification techniques, other evident goals are full automation and the use of an internal control in each sample, as suggested by Ros Bascañana and Belák³⁷ and Rosenstrauss et al.⁴⁸ Specifically, Baselga et al³¹ and Mar-

chetti et al³² have suggested that the β -globin gene might serve that function.

CONCLUSION

Amplification techniques offer rapid results in the diagnosis of pleural tuberculosis, when they prove sensitive. The sensitivities of the AMTDT and LCxMTB were 52.6% and 63.2%, respectively, in PEB tissues, and the specificity was 100% in both tests. By using both, a sensitivity of 80.7% was achieved in tuberculous PEB samples. Amplification techniques added 22.8% to etiologic diagnoses provided by culture alone.

We have shown that gene amplification in PEB tissues can achieve retrospective diagnoses of pleural tuberculosis. Although amplification techniques proved somewhat useful in archival PEB tissues, and may be more useful in fresh samples, sensitivity must be improved, possibly by standardizing protocols. We believe these results in PEB samples justify the performance of larger studies to establish the real value of these methods in fresh pleural tissues, our hypothesis being that the results will be at least as good as those achievable in PEB tissues.

ACKNOWLEDGMENT: The authors would like to thank Dr. Irma Casas for the statistical analysis and Ms. Mary Ellen Kerans for assistance with the English version of the article.

REFERENCES

- 1 Light RW, Ferrer J. Diagnóstico de la tuberculosis pleural. Arch Bronconeumol 1999; 35:105-107
- 2 Valdés L, San José E, Álvarez D, et al. Diagnosis of tuberculous pleurisy using the biologic parameters adenosine deaminase, lysozyme, and interferon- γ . Chest 1993; 103:458-465
- 3 Villena V, López-Encuentra A, Echave-Sustaeta J, et al. Interferon-gamma in 388 immunocompromised and immunocompetent patients for diagnosing pleural tuberculosis. Eur Respir J 1996; 9:2635-2639
- 4 Haro M, Ruiz-Manzano J, Gallego M, et al. Tuberculosis pleural: análisis de 105 casos. Enferm Infecc Microbiol Clín 1996; 14:285-289
- 5 Abe C, Hirano K, Wada M, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test. J Clin Microbiol 1993; 31:3270-3274
- 6 Clarridge JE III, Shawar RM, Shinninck TM, et al. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. J Clin Microbiol 1993; 31:2049-2056
- 7 Ichiyama S, Iinuma Y, Tawada Y, et al. Evaluation of Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test and Roche PCR- microwell plate hybridization method (AMPLICOR MYCOBACTERIUM) for direct detection of mycobacteria. J Clin Microbiol 1996; 34:130-133
- 8 Gamboa F, Manterola JM, Viñado B, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in nonrespiratory specimens by Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test. J Clin Microbiol 1996; 34:130-133

- culosis* Direct Test. J Clin Microbiol 1997; 35:307–310
- 9 Querol JM, Mínguez J, García-Sánchez E, et al. Rapid diagnosis of pleural tuberculosis by polymerase chain reaction. Am J Respir Crit Care Med 1995; 142:1977–1981
 - 10 Folgueira L, Delgado R, Palenque E, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples by using a simple lysis method and polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31:1019–1021
 - 11 Stauffer F, Mutschlechner R, Hasenberger P, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical specimens by a commercial polymerase chain reaction kit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995; 14:1046–1051
 - 12 Tacquet A, Tison F. Nouvelle technique d'isolement des mycobactéries par le lauryl-sulphate de sodium. Ann Inst Pasteur (Lille) 1961; 100:676–680
 - 13 Goto M, Oka S, Okazumi K, et al. Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. J Clin Microbiol 1991; 29:2473–2476
 - 14 Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al, eds. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York, NY: Academic Press, 1990; 153–158
 - 15 Bodmer T, Gurtner A, Schopfer K, et al. Screening of respiratory tract specimens for the presence of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test. J Clin Microbiol 1994; 32:1483–1487
 - 16 Ehlers S, Pirmann M, Zaki W, et al. Evaluation of a commercial rRNA target amplification assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13:827–829
 - 17 Gamboa F, Fernández G, Padilla E, et al. Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. J Clin Microbiol 1998; 36:684–689
 - 18 Jonas V, Alden MJ, Curry JI, et al. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. J Clin Microbiol 1993; 31:2410–2416
 - 19 La Rocco MT, Wanger A, Ocera H, et al. Evaluation of a commercial rRNA amplification assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in processed sputum. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13:726–731
 - 20 Pfyffer GE, Kissling P, Wirth R, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by a target-amplified test system. J Clin Microbiol 1996; 32:918–923
 - 21 Vlasopolder F, Singer P, Roggeveen C. Diagnostic value of an amplification method (Gen-Probe) compared with that of culture for diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol 1995; 33:2699–2703
 - 22 Pfyffer GE, Kissling P, Jahn EMI, et al. Diagnostic performance of Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory, and respiratory specimens. J Clin Microbiol 1996; 34:834–841
 - 23 Ehlers S, Ignatius R, Regnath T, et al. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test. J Clin Microbiol 1996; 34:2275–2279
 - 24 Alonso P, Orduña A, Bratos MA, et al. Clinical evaluation of a commercial ligase-based gene amplification method for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17:371–376
 - 25 Ausina V, Gamboa F, Gazapo E, et al. Evaluation of the semiautomated Abbott LCxMTB *Mycobacterium tuberculo-*
sis assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. J Clin Microbiol 1997; 35:1996–2002
 - 26 Tortoli E, Lavinia F, Simonetti MT. Evaluation of a commercial ligase chain reaction kit (Abbott LCxMTB) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. J Clin Microbiol 1997; 35:2424–2426
 - 27 Yuen KY, Yam WC, Wong LP, et al. Comparison of two automated DNA amplification systems with a manual one-tube nested PCR assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 1997; 35:1385–1389
 - 28 Gamboa F, Domínguez J, Padilla E, et al. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by ligase chain reaction amplification. J Clin Microbiol 1998; 36:1324–1329
 - 29 Degitz K, Steidl M, Neubert U, et al. Detection of mycobacterial DNA in paraffin-embedded specimens of lupus vulgaris by polymerase-chain reaction. Arch Dermatol Res 1993; 285:168–170
 - 30 Degitz K, Steidl M, Thomas P, et al. Etiology of tuberculids. Lancet 1993; 341:239–240
 - 31 Baselga E, Margall N, Barnadas MA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* DNA in papulonecrotic tuberculid [letter]. Arch Dermatol 1996; 132:92–94
 - 32 Marchetti G, Gori A, Catozzi L, et al. Evaluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: comparison of four amplification assays. J Clin Microbiol 1998; 36:1512–1517
 - 33 Wichitwechkarn J, Karnjan S, Shuntawuttisetee S, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* infection by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33:45–49
 - 34 Cegielski JP, Devlin BH, Morris AJ, et al. Comparison of PCR, culture, and histopathology for diagnosis of tuberculous pericarditis. J Clin Microbiol 1997; 35:3254–3257
 - 35 Bonington A, Strang JIG, Klapper PE, et al. Use of Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR in early diagnosis of tuberculous meningitis. J Clin Microbiol 1998; 36:1251–1254
 - 36 Palacios JJ, Ferro J, Ruiz Palma N, 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; 17:767–772
 - 37 Ros Bascuñana C, Belák K. Detection and identification of mycobacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested PCR and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 1996; 34:2351–2355
 - 38 Noordhoek GT, van Embden JDA, Kolk AHJ. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. J Clin Microbiol 1996; 34:2522–2525
 - 39 Noordhoek GT, Kolk AHJ, Bjune G, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. J Clin Microbiol 1994; 32:277–284
 - 40 Roth A, Schaberg T, Mauch H. Molecular diagnosis of tuberculosis: current clinical validity and future perspectives. Eur Respir J 1997; 10:1877–1891
 - 41 Rish JA, Eisenach KD, Cave MD, et al. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed tissue. Am J Respir Crit Care Med 1996; 153:1419–1423
 - 42 Kirschner P, Rosenau J, Springer B, et al. Diagnosis of mycobacterial infections by nucleic acid amplification: 18 months prospective study. J Clin Microbiol 1996; 34:304–312
 - 43 Bodmer T, Möckl E, Mühlemann K, et al. Improved perfor-

- mance of Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test when 500 instead of 50 μL of decontaminated sediment is used. J Clin Microbiol 1996; 34:222-223
- 44 Kox LFF, Rhienthong D, Medo A, et al. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J Clin Microbiol 1994; 32:672-678
- 45 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid-guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162:156-159
- 46 Amicosante M, Richeldi L, Trenti G, et al. Inactivation of polymerase inhibitors for *Mycobacterium tuberculosis* DNA amplification in sputum by using capture resin. J Clin Microbiol 1995; 33:629-630
- 47 Pierre C, Lecossier D, Boussougant Y, et al. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. J Clin Microbiol 1991; 29:712-717
- 48 Rosenstraus M, Wang Z, Chang S-Y, et al. An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. J Clin Microbiol 1998; 36:191-197

AMERICAN COLLEGE OF
CHEST
PHYSICIANS

Cardiopulmonary Wellness & Rehabilitation

February 11- 14, 2001

Telluride Conference Center, Telluride, CO

**For information call: 800-343-ACCP or 847-498-1400
or visit: www.chestnet.org**

ARTÍCULO IV

Article

Comparison of a Nonradiometric System with Bactec 12B and Culture on Egg-Based Media for Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens

J.M. Manterola, F. Gamboa, E. Padilla, J. Lonca, L. Matas, A. Hernández, M. Giménez, P.J. Cardona, B. Viñado, V. Ausina

Abstract The MB/BacT (Organon-Teknika, USA) is a fully automated, rapid, nonradiometric system for the culture of mycobacteria from clinical samples. The rate of recovery of mycobacteria and the time to detection obtained with the MB/BacT were compared with those obtained with Löwenstein-Jensen and Coletsos solid media and Bactec 7H12 (12B) (Becton-Dickinson, USA) broth when 600 processed specimens were inoculated into all media in parallel. Specimens included 383 respiratory samples, 20 urine samples, 23 purulent exudates, 13 stool samples, 103 blood samples, 14 bone marrow aspirates, and 44 body fluid samples or aspirates. Overall, 106 mycobacterial isolates comprising six species were recovered, of which 100 (94.3%) were detected with MB/BacT, 98 (92.5%) with egg-based media, and 96 (90.2%) with Bactec 12B. The recovery rates of *Mycobacterium tuberculosis* complex with MB/BacT, egg-based media, and Bactec 12B were 98.7%, 93.7, and 89.9%, respectively. The average number of days to detection of single mycobacterial isolates was 14.2 days for MB/BacT, 26.1 days for egg-based media, and 11.7 days for Bactec 12B. The contamination rates were higher in MB/BacT (5%) than in Bactec 12B (1.8%) or egg-based media (1.5%). MB/BacT is a reliable, nonradiometric, less labor-intensive alternative to Bactec 12B for recovery of mycobacteria, but, as with other liquid culture methods, MB/BacT should be used in combination with a solid medium, not on its own.

Introduction

Mycobacterial disease due to *Mycobacterium tuberculosis* remains a public health concern both in developing and industrialized countries [1, 2]. In addition,

isolation rates of *Mycobacterium avium* complex and other nontuberculous mycobacteria (NTM) have increased as a result of the AIDS pandemic [3–6]. This underscores the need for a rapid, reliable method for the culture and identification of mycobacteria from clinical specimens.

J.M. Manterola, F. Gamboa, E. Padilla, J. Lonca, L. Matas, A. Hernández, M. Giménez, P.J. Cardona, B. Viñado, V. Ausina (✉)

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet s/n, 08916, Badalona, Barcelona, Spain

J.M. Manterola, L. Matas, V. Ausina
Departamento de Genética y Microbiología,
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona,
Barcelona, Spain

F. Gamboa
Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Unidad de Microbiología Especial, Pontificia Universidad Javeriana,
Bogotá, Colombia

During the past several years, considerable effort has been directed toward the development of rapid, efficient systems for growth and detection of mycobacteria and more rapid methods of mycobacterial identification. For many years, the only culture system with the potential to provide this target turnaround time was the radiometric method Bactec TB 460 (Bactec TB; Becton Dickinson, USA), which not only decreases the time to detection of mycobacteria but also increases the rate of recovery [7, 8]. However, many countries have placed severe restrictions on the utilization of ¹⁴C radiolabelled culture media, mainly due to problems related to

disposal of radioactive waste. The radiometric system is therefore not available in many laboratories.

The MB/BacT system (MB/BacT; Organon Teknika, USA) is a fully automated, rapid, nonradiometric system for the culture of mycobacteria from clinical specimens other than blood. The MB/BacT system employs a colorimetric sensor and reflected light to monitor the presence and production of carbon dioxide (CO₂) dissolved in the culture medium. If mycobacteria are present in the test sample, CO₂ is produced as the organisms metabolize the substrates in the culture medium. When growth of the microorganisms produces CO₂, the color of the gas-permeable sensor at the bottom of each culture bottle changes from dark green to bright yellow. The lighter color results in an increase of reflectance units monitored by the system.

The purpose of this study was to evaluate the MB/BacT system for routine use in a clinical laboratory by comparing the rates of isolation and times to detection of mycobacteria from clinical specimens with results obtained using the Bactec system and culture on egg-based media.

Materials and Methods

Patients and Clinical Specimens. In this study we included 600 consecutive samples collected from September through December 1996. We investigated 383 respiratory specimens collected from 255 patients and 217 nonrespiratory specimens (20 urine specimens, 23 purulent exudates, 13 faeces, 103 blood specimens, 14 bone marrow aspirates and 44 body fluid specimens or other aspirates) from 160 patients. The 383 respiratory specimens included 330 expectorated sputa, 26 bronchial or tracheal aspirates, 18 bronchoalveolar lavage fluid (BAL) specimens and six gastric juice aspirates. Once collected, specimens were kept at 4°C prior to processing. Gastric aspirates were immediately neutralized with trisodium phosphate buffer after retrieval. Tissue specimens were sliced and homogenized in a mortar under sterile conditions before processing. Urine and other fluid (>30 ml of BAL, etc.) samples were centrifuged at 3600 × g for 20 min prior to processing.

Decontamination Procedures. With the exception of bone marrow aspirates and blood specimens, the samples were digested and decontaminated with sodium dodecyl (lauryl) sulfate (SDS)-NaOH as previously described [9, 10]. A volume equivalent to a "pea" of the stool specimen after being diluted 1:5 with saline was decontaminated as other samples. The cell pellets were washed with 30 ml of sterile distilled water and centrifuged for 20 min at 3300 × g and the supernatant removed. Bone marrow aspirates were received in Isolator tubes (Wampole Laboratories, USA) and blood specimens in anticoagulated tubes. Samples of 5 ml of blood and 1 ml of bone marrow aspirate were treated with 500 and 100 µl, respectively, of 10% SDS. After being vortexed for 5 min, the samples were rinsed with 30 ml of sterile distilled water and centrifuged (3300 × g, 20 min), and the supernatant was removed. The sediment from all specimens was finally resuspended in 2.2 ml of 0.067 M phosphate buffer (pH 6.8).

Microscopy. Smears were made with 50 µl of sediment after decontamination and centrifugation. Smears were stained by

auramine-rhodamine fluorochrome as a screening method. Positive slides were confirmed to be positive by the Ziehl-Neelsen stain [11].

Culture. Equal aliquots of 0.25 ml of the processed sediment were inoculated onto two solid slants, Löwenstein-Jensen and Coletsos. The Coletsos medium is an egg-based medium containing pyruvate, gelatine, salts solution, asparagine, glutamate, glycerine, and malachite green; use of this medium enables faster detection of *Mycobacterium bovis* and dysgonic strains of *Mycobacterium tuberculosis* [12]. Slants were incubated at 37°C for 8 weeks in a humidified atmosphere. In addition, 500 µl of the sediment was inoculated into each liquid medium, Bactec 12B and MB/BacT, and incubated at 37°C for 8 weeks. Solid media were read weekly, and Bactec cultures were read twice weekly for the first 2 weeks and once weekly thereafter. A Bactec growth index of ≥100 was considered positive, and smears for Ziehl-Neelsen staining and culture on solid media were prepared to detect acid-fast bacilli.

The MB/BacT system consists of a bottle containing basic broth (Middlebrook 7H9; Organon Teknika), casein, bovine serum albumin, and catalase. Bottles contain 10 ml of media and are prepared with an atmosphere of CO₂ in oxygen under vacuum. They are designed for use with the MB/BacT antibiotic supplement (amphotericin B 0.018% w/v, azlocillin 0.0034% w/v, nalidixic acid 0.04% w/v, polymyxin B 10000 U, and trimethoprim 0.0105% w/v).

Identification of Mycobacteria. Routine biochemical methods [11], gas-liquid chromatography [13], and the Accuprobe culture confirmation test (Gen-Probe; USA) [14] were employed for the identification of isolates.

Statistical Analysis. The isolation rates of the three systems were evaluated by the McNemar modification of the chi-square test [15].

Results

In total 600 specimens were included in the study, of which 106 (17.7%) yielded mycobacteria. Of these 106 cultures, 79 grew *Mycobacterium tuberculosis* and 27 grew nontuberculous mycobacteria (NTM). Of the 106 culture-positive specimens, 68 (64.1%) were acid-fast smear-positive and 38 (35.9%) were smear-negative. The mycobacteria were isolated from 64 sputum specimens, eight purulent exudates, seven bronchial aspirates, five blood specimens, four BAL specimens, three faeces, two urine specimens, two bone marrow aspirates, two gastric juice aspirates, and nine miscellaneous samples.

Table 1 summarizes the rate of recovery of mycobacteria by each culture system. Ninety-eight (92.5%) isolates were recovered by culture on LJ and Coletsos media, 96 (90.6%) by Bactec, and 100 (94.3%) by MB/BacT. MB/BacT was the most effective system for the recovery of *Mycobacterium tuberculosis*. Of the 79 *Mycobacterium tuberculosis* strains recovered by all methods combined, 98.7% were recovered by MB/BacT, 89.9% by Bactec ($P=0.04$), and 93.7% by culture on LJ and Coletsos media. A comparison of the mycobacterial recovery rates of the three systems in combination is presented in Table 2. The combination

Table 1 Recovery of mycobacterial species from different media

| Microorganism | No. (%) of isolates recovered | | | Total |
|------------------------|-------------------------------|-----------|---------------------|-------|
| | LJ+CO | Bactec | MB/BacT | |
| <i>M. tuberculosis</i> | 74 (93.7) | 71 (89.9) | 78 (98.7) | 79 |
| <i>M. kansasii</i> | 9 (100) | 8 (88.8) | 6 (66.6) | 9 |
| <i>M. xenopi</i> | 2 (50) | 4 (100) | 2 ^a (50) | 4 |
| <i>M. avium</i> | 10 (90.9) | 11 (100) | 11 (100) | 11 |
| <i>M. fortuitum</i> | 2 (100) | 1 (50) | 2 (100) | 2 |
| <i>M. spp.</i> | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) | 1 |
| Total | 98 (92.5) | 96 (90.6) | 100 (94.3) | 106 |

^a One isolate was recovered only in subculture from MB/BacT LJ, Löwenstein-Jensen medium; CO, Coletsos medium

of egg-based media and MB/BacT was superior to egg-based media and Bactec for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Egg-based media and MB/BacT together detected 100% of *Mycobacterium tuberculosis* isolates.

The rates of recovery of mycobacteria from smear-positive and smear-negative specimens are presented in Table 3. The two *Mycobacterium tuberculosis* isolates from smear-positive specimens culture-negative in Löwenstein-Jensen-Coletsos and Bactec corresponded to patients treated with antituberculosis drugs; only one smear-positive *Mycobacterium fortuitum* isolate was not recovered by the Bactec system. MB-BacT was significantly superior to Bactec for isolation of *Mycobacterium tuberculosis* from smear-negative specimens

($P=0.004$). All NTM were clinically significant except for three smear-negative *Mycobacterium xenopi* isolates and two smear-positive *Mycobacterium fortuitum* isolates. There was no significant difference between the three media regarding isolation of clinically significant NTM.

Of 103 blood samples and 14 bone marrow aspirates collected from AIDS patients, seven yielded mycobacterial growth (2 *Mycobacterium tuberculosis*, 3 *Mycobacterium avium* complex, 1 *Mycobacterium kansasii*, and 1 *Mycobacterium spp.* isolates). The rates of recovery of mycobacteria from blood using different media were not statistically significant: five isolates (71.4%) were recovered on Löwenstein-Jensen and Coletsos media and six (85.7%) in Bactec and MB-BacT, respectively.

Contamination rates were higher with the MB-BacT (5%) than with Bactec (1.5%) or egg-based (1.5%) media ($P<0.001$). The contamination in MB/BacT was due to *Bacillus spp.* ($n=18$), *Enterococcus faecalis* ($n=3$), *Corynebacterium spp.* ($n=3$), *Streptomyces spp.* ($n=2$), *Staphylococcus epidermidis* ($n=1$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n=1$), *Aspergillus fumigatus* ($n=1$), and *Candida guilliermondii* ($n=1$). Two isolates of *Mycobacterium tuberculosis* on solid media and one *Mycobacterium kansasii* in MB/BacT were missed due to contamination; no isolate in Bactec was missed.

Isolation times for mycobacteria recovered from smear-positive and smear-negative specimens are shown in

Table 2 Recovery of mycobacteria in different combinations of media

| Microorganism (no.) | No. (%) of isolates recovered | | |
|------------------------------|-------------------------------|---------------------|------------------|
| | Egg media + Bactec | Egg media + MB/BacT | Bactec + MB/BacT |
| <i>M. tuberculosis</i> (79) | 75 (94.9) | 79 (100) | 78 (98.7) |
| <i>M. kansasii</i> (9) | 9 (100) | 9 (100) | 8 (88.9) |
| <i>M. xenopi</i> (4) | 4 (100) | 2 (50) | 4 (100) |
| <i>M. avium</i> complex (11) | 11 (100) | 11 (100) | 11 (100) |
| <i>M. fortuitum</i> (2) | 2 (100) | 2 (100) | 2 (100) |
| <i>M. spp.</i> (1) | 1 (100) | 1 (100) | 1 (100) |
| Total (106) | 102 (96.2) | 104 (98.1) | 104 (98.1) |

Table 3 Recovery of mycobacteria from 106 culture-positive specimens with different media

| Type of isolate (no.) | No. (%) isolates detected | | |
|-----------------------------|---------------------------|------------------------|----------|
| | LJ+CO | Bactec | MB/BacT |
| Smear-positive | | | |
| <i>M. tuberculosis</i> (54) | 52 ^a (96.3) | 52 ^a (96.3) | 54 (100) |
| Smear-negative | | | |
| <i>M. tuberculosis</i> (25) | 22 (88) | 19 (76) | 24 (96) |
| Smear-positive NTM (14) | 14 (100) | 13 ^b (92.8) | 14 (100) |
| Smear-negative NTM (13) | 10 (76.9) | 12 (92.3) | 7 (53.8) |

^a Two isolates from patients receiving antituberculosis treatment were missed

^b One *M. fortuitum* isolate was missed

LJ, Löwenstein-Jensen medium; CO, Coletsos medium; NTM, nontuberculous mycobacteria

Table 4 Average number of days to detection of mycobacteria in each system from smear-positive and smear-negative specimens

| Smear result (no.) | Average no. of days to detection (range) | | |
|-----------------------------|--|--------------|--------------------------|
| | LJ + CO | Bactec | MB/BacT |
| Smear-positive | | | |
| <i>M. tuberculosis</i> (54) | 22.3 (13–50) | 9.7 (2–25) | 13.8 (4–42) |
| Smear-negative | | | |
| <i>M. tuberculosis</i> (25) | 34.2 (22–60) | 22.5 (10–42) | 20.2 (11–36) |
| Smear-positive NTM (14) | 24.7 (6–48) | 8.9 (4–19) | 11.9 (4–43) |
| Smear-negative NTM (13) | 32.4 (15–53) | 19.7 (6–52) | 10.3 ^a (7–14) |
| All mycobacteria (106) | 26.1 (6–60) | 11.7 (2–52) | 14.2 ^a (4–43) |

^a Three slow-growing *M. xenopi* were missed
LJ, Löwenstein-Jensen medium; CO, Coletsos medium; NTM, nontuberculous mycobacteria

Table 4. Bactec and MB-BacT detected growth of *Mycobacterium tuberculosis* and NTM growth earlier than LJ and Coletsos media from smear-positive and smear-negative specimens. The overall mean times were 11.7 days for Bactec, 14.2 days for MB-BacT, and 26.1 days for egg-based media. However, MB-BacT detected *Mycobacterium tuberculosis* growth from smear-negative specimens earlier than Bactec (20.2 and 22.5 days, respectively). Isolation times for mycobacteria recovered from blood specimens were 8.3 days for Bactec, 11.8 days for MB-BacT, and 33.6 days for egg-based media.

Discussion

Rapid diagnosis of tuberculosis is critical to control of the disease; therefore, use of the most rapid methods available for culture and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex is advocated [16, 17]. For mycobacterial culture, use of both a liquid and a solid medium is recommended, and if possible, the combination of media should allow detection of growth within 14 days of receipt of the specimen in the laboratory [17]. Bactec TB has been the most sensitive and rapid mycobacterial culture system available for several years [7, 8]. However, a nonradiometric culture system as reliable as Bactec TB but less labor-intensive is desirable.

In this study we evaluated the MB-BacT system, a fully automated, continuously monitoring instrument, by comparing its performance, when used as indicated by the manufacturer, with that of the Bactec 460 TB system and culture on Löwenstein-Jensen and Coletsos solid media, which constitute our usual laboratory protocol.

Results of our evaluation showed that MB-BacT detected the specimens with viable mycobacteria ($n=100$, 94.3% of all isolates) as well as or better than the Bactec radiometric system ($n=96$, 90.6%) or the two egg-based media Löwenstein-Jensen and Coletsos ($n=98$; 92.5%).

MB-BacT was significantly superior to Bactec ($P=0.04$) in detecting *Mycobacterium tuberculosis*. The overall rates of recovery of NTM by the three media evaluated were comparable, with the exception of *Mycobacterium xenopi*, which was recovered better from Bactec than it was from egg-based media or MB-BacT. Compared with isolation rates of mycobacteria from solid media and Bactec, MB-BacT performed significantly better overall. However, neither MB-BacT nor Bactec liquid media recovered all isolates of mycobacteria.

In regard to turnaround times, the mean times to detection of *Mycobacterium tuberculosis* and NTM were similar to MB-BacT and Bactec. Although the mean times to growth and detection of mycobacteria approached the target of 14 days suggested by the Centers for Disease Control and Prevention [1] with both the MB-BacT and the Bactec systems, neither medium detected all isolates of *Mycobacterium tuberculosis* within this time period. Of the isolates recovered in each respective system, 64% of *Mycobacterium tuberculosis* were detected by day 14 with MB-BacT, 52% with Bactec, and 32% with egg-based media.

The MB-BacT system allowed easy rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* complex by the Accuprobe system and NTM by chromatographic procedures without the further incubation or centrifugation necessary when using Bactec vials [18].

The Bactec system is a reference method. Despite all advantages [7, 8, 11, 19–21], it has certain limitations. It does not permit observation of colony morphology and mixed cultures; is associated with greater costs and increased workload; requires radioactive reagents and the use of needles; and cross-contamination may occur [22, 23]. The recently developed MB-BacT, approved by the U.S. Food and Drug Administration since July 1996, is the first fully automated system for the culture of mycobacteria. Of its several advantages, perhaps most important, is that it is less labor-intensive than the Bactec system. Bottles are placed once in the MB-BacT

instrument, whereas with Bactec, vials are incubated off line in an incubator and then loaded and unloaded at several specified times during the total incubation period [21]. The Bactec system requires a separate CO₂ tank, and the needles must be manually inspected and sterilized daily; MB-BacT has neither CO₂ tanks nor needles.

MB-BacT is nonradiometric, thus eliminating all of the problems associated with the use and disposal of radioactive material. Moreover, the MB-BacT eliminates the possibility of cross-contamination of bottles by the instrument, which has been a problem with the radiometric Bactec system [22, 23]. In this study the contamination rate with MB-BacT was higher than that with the Bactec system. Gram-positive organisms constituted 90% of the contaminants. To address this issue, the manufacturer is evaluating various modifications of the supplement of antimicrobial agents that is added to each of the culture bottles.

In summary, the MB-BacT system is a reliable, nonradiometric, less labor-intensive alternative to Bactec for growth and detection of mycobacteria. However, as with Bactec or any other liquid culture system, we recommend that MB-BacT be used not on its own but in combination with another culture method.

References

- Centers for Disease Control and Prevention: Tuberculosis morbidity – United States (1995). *Morbidity and Mortality Weekly Report* (1996) 46:365–370
- Snider DE, Roper WL: The new tuberculosis. *New England Journal of Medicine* (1992) 326:703–705
- Benson CA: Disease due to the *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS: epidemiology and clinical syndrome. *Clinical Infectious Diseases* (1994) 18, Supplement 3:218–222
- Falkinham JO III: Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiological Reviews* (1996) 9:177–215
- Horsburgh CR Jr: *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *New England Journal of Medicine* (1991) 324:1332–1338
- Horsburgh CR Jr, Selik R: The epidemiology of disseminated non-tuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *American Review of Respiratory Disease* (1989) 139:4–7
- Abe C, Hosojima S, Fukasawa Y, Kazumi Y, Takahashi M, Hirano K, Mori T: Comparison of MB-Check, Bactec, and egg-based media for recovery of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* (1992) 30:878–881
- Anargyros P, Astill DSJ, Lim ISL: Comparison of improved Bactec and Löwenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* (1990) 28:1288–1291
- Pfyffer GE, Kissling P, Jahn EMI, Welscher H-M, Salfinger M, Weber R: Diagnostic performance of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory, and respiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology* (1996) 34:834–841
- Salfinger M, Kafader FM: Comparison of two pretreatment methods for the detection of mycobacteria of Bactec and Löwenstein-Jensen slants. *Journal of Microbiological Methods* (1987) 6:315–321
- Heifets LB, Good RC: Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis. In: Bloom BR (ed): *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. American Society for Microbiology, Washington DC (1994) pp. 85–110
- Coletso PJ: Milieu et modalités de culture adaptés à la réanimation et à la multiplication in vitro de *Mycobacterium tuberculosis* de vitalité réduite de viabilité éphémère ou en état de quiescence. *Annales de l'Institut Pasteur* (1960) 99:475–495
- Luquin M, Ausina V, López-Calahorra F, Belda F, García-Barceló M, Celma C, Prats G: Evaluation of practical chromatographic procedures for identification of clinical isolates of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* (1991) 29:120–130
- Goto M, Oka S, Okuzumi K, Kimura S, Shimada K: Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. *Journal of Clinical Microbiology* (1991) 29:2473–2476
- Breslow NE, Day NE (eds): *Statistical methods in cancer research. The analysis of case-control studies*. Lyon International Agency for Research on Cancer, Lyon (1980) pp. 165
- Anhalt JP, Witebsky FG, Woods GL: College of American Pathologists position statement regarding rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* (1993) 117:873
- Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR Jr, Good RC: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *Journal of Clinical Microbiology* (1993) 31:767–770
- Duffey PS, Guthertz LS, Evans GC: Improved rapid identification of mycobacteria by combining solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography analysis of Bactec cultures. *Journal of Clinical Microbiology* (1996) 34:1939–1943
- Morgan MA, Horstmeier CD, De Young DR, Roberts GD: Comparison of a radiometric method (Bactec) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. *Journal of Clinical Microbiology* (1983) 18:689–696
- Nolte FS, Metchock B: *Mycobacterium*. In: Murray P, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds): *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC, (1995) pp. 400–437
- Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, Larsh HW, Lindner TH, McClatchy JK, McGinnis MR, Siddiqi SH, Wright P: Evaluation of the Bactec radiometric method for recovery of mycobacteria and drug-susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. *Journal of Clinical Microbiology* (1983) 18:689–696
- Conville PS, Witebsky FG: Inter-bottle transfer of mycobacteria by the Bactec 460. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* (1989) 12:401–405
- Vannier AM, Tarrand JJ, Murray PR: Mycobacterial cross contamination during radiometric culturing. *Journal of Clinical Microbiology* (1988) 26:1867–1868