

Hoy día, las enfermedades producidas por micobacterias siguen siendo de gran importancia en la medicina y salud pública mundiales. Baste recordar que la enfermedad infecciosa ocasionada por una micobacteria conocida de más antiguo, la lepra, sigue aún siendo un grave problema sanitario, con unos 6-8 millones de casos anuales, con un tratamiento muy largo y un diagnóstico de laboratorio muy precario, donde la visualización microscópica sigue siendo el método más habitual en la rutina clínica diagnóstica. La serología con antígenos glucolípidos fenólicos no ha resultado todo lo eficaz que se pensaba y las técnicas genéticas de microbiología molecular no han llegado aún a la rutina.

Sin duda, son la tuberculosis y las micobacteriosis los dos grupos de enfermedades que recientemente han tenido un gran desarrollo en sus técnicas de microbiología clínica, bien de diagnóstico de la enfermedad, bien en el diagnóstico de la resistencia a fármacos antimicobacterianos o bien en las técnicas de tipificación con fines epidemiológicos. Y todo ello debido, por una parte, a la importancia en sí de estas enfermedades y, por otra, al hecho de producirse en países con gran nivel tecnológico, económico y de desarrollo, como los Estados Unidos de América.

En este sentido, el problema de la coinfección VIH y tuberculosis, y la aparición del fenómeno de la resistencia múltiple a fármacos (MDR), ha provocado el llamado fenómeno de la *reemergencia* de la tuberculosis, con diez millones de casos anuales y unos tres millones de muertos al año, lo que la hace más mortal que el SIDA, y que esté infectando a una tercera parte de la población.

Por su parte las micobacteriosis, es decir, las enfermedades ocasionadas por micobacterias atípicas diferentes a las del complejo tuberculosis o lepra son cada día más frecuentes. Así, la infección por el VIH, ha creado el sustrato que ha conducido, en estos últimos años, a la descripción de numerosas nuevas especies de micobacterias atípicas. Este hecho complica enormemente el diagnóstico microbiológico y la terapéutica clínica ante un enfermo con una visualización microscópica o PCR positivas. Entre las micobacterias atípicas causantes de patología humana recientemente descritas hemos de citar a *Mycobacterium genavense*, *M. celatum*, *M. intermedium*, *M. interjectum*, *M. branderi*, *M. conspicuum*, *M. mucogenicum*, *M. lentiflavum*, *M. buckleyi*, *M. bohemium*, *M. heidelbergense* y *M. novocastrense*. Para este tipo de enfermos sí hemos tenido en los últimos años un extraordinario avance en los métodos de microbiología clínica. Así, para el diagnóstico microbiológico confirmativo hemos pasado de la simple microscopía a la microscopía concentrada y fluorescente, que aumenta extraordinariamente la sensibilidad sin perder especificidad, con la posibilidad de dar el resultado en el mismo día.

También las técnicas directas de detección de microbiología molecular nos han aportado numerosas posibilidades, bien con técnicas de amplificación genética de las que existen numerosas variantes, como la PCR, la más conocida, o bien desarrollando las sondas genéticas que, en su segunda generación, constituyen sin duda buenas herramientas para su uso en centros con experiencia que las apliquen en circunstancias adecuadas. Como ventajas, son técnicas rápidas; también tienen inconvenientes, como su elevado coste, su complejidad técnica en comparación con la simple microscopía, o el hecho de que no existan sistemas comerciales aplicables a todas las micobacterias que podemos encontrar en las muestras clínicas.

Otros métodos más laboriosos, como la detección directa en muestras clínicas de compuestos químicos por cromatografía de gases y espectrometría de masas, como el ácido tuberculoesteárico, han quedado un poco abandonados por su complejidad y coste. Disponemos, asimismo, de diversas tecnologías en desarrollo aplicadas a la detección directa de las micobacterias en muestras clínicas, tales como como la cromatografía (HPLC) o la detección de antígenos, las cuales aún no han conseguido una sensibilidad lo suficiente buena como para su uso en rutina clínica diagnóstica. Quedaría también pendiente de desarrollo un equipo automatizado de microscopía que permitiera obtener un resultado preliminar inmediato.

Aparte de la detección directa en muestras clínicas, también se han producido avances en los sistemas de cultivo, que han ido pasando de los convencionales medios sólidos de Löwenstein o Middlebrook, de lectura tardía, (un mes por término medio; entre 15 y 60 días), a los medios bifásicos, como el medio Septi-Check® , o al medio líquido MGIT, ambos de lectura más rápida (7 ó 10 días). También hemos podido disponer de sistemas de cultivo totalmente automáticos, con procesamiento informático acompañante, que detectan el desarrollo de la micobacteria e informan de los resultados. Así, el sistema ESP-II® , que viene a compararse con el ya conocido sistema de referencia, el semiautomático y radiométrico BACTEC® 460-TB, con la ventaja de obviar la necesidad de utilizar material radioactivo. Este sistema (ESP-II® ), totalmente automático, es, sin duda, la mayor aportación reciente al diagnóstico rápido y eficaz de rutina en tuberculosis y micobacteriosis. Otros sistemas que persiguen el mismo fin, como el BaC-T-Alert® o MGIT® , se encuentran actualmente en desarrollo.

En el campo del diagnóstico indirecto, si bien se ha investigado mucho en técnicas serológicas, no podemos decir que exista aún ninguna lo suficientemente válida y aceptada por la comunidad científica internacional como para que pueda usarse de forma habitual en los laboratorios de microbiología clínica.

En la tipificación diagnóstica de las especies de micobacterias, los clásicos sistemas de diferenciación morfológica o bioquímica, de gran utilidad pero también de gran lentitud, han sido complementados con técnicas de hibridación que han desarrollado sondas para identificación de algunas micobacterias, como *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii* o el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, o con también técnicas de amplificación genética. Por su parte, las técnicas

de detección de ácidos micólicos mediante cromatografía HPLC, junto a los métodos de microbiología molecular, como la secuenciación genética (RNA 16S), son técnicas de posible utilidad en laboratorios de referencia, los cuales necesitan resolver las complejas identificaciones de las nuevas especies de micobacterias atípicas descritas recientemente. Por desgracia, la diferenciación rápida de los miembros del *complejo tuberculosis*, en especial la diferenciación entre sí de *M. tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* aún no puede hacerse fácilmente con alguna de estas nuevas técnicas.

En relación con el diagnóstico de la resistencia a fármacos, también se han producido avances técnicos, aparte de los métodos convencionales y del sistema radiométrico BACTEC®. Así, diferentes sistemas utilizan la bioluminiscencia, la fluorescencia, la hibridación, la luciferasa o bien la PCR-SSCP. No obstante, la mayoría de ellas, por su complejidad o coste, sólo se utilizan en algunos laboratorios de referencia. De nuevo, el sistema automático ESP-II vuelve a ser la mayor aportación reciente en este campo, complementando al clásico y semiautomático BACTEC® 460 TB radiométrico, que sigue siendo, junto al de las proporciones, el método de referencia.

Dentro de la microbiología clínica con fines epidemiológicos, también la microbiología molecular aporta técnicas como la RFLP o el *spoligotyping*, que permiten sustituir otras técnicas más antiguas (fagotipia, micobacteriocinas o micobiovariedades enzimáticas). No obstante, dadas su actual complejidad y coste, tampoco suelen usarse en rutina, limitándose su uso a centros con amplia experiencia en ellas.

En resumen, podemos decir que, en los últimos años, la microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias ha tenido un extraordinario desarrollo y probablemente lo siga teniendo en los próximos años. No obstante, se podrían diferenciar dos tipos de protocolos de trabajo. Uno, el de práctica diagnóstica diaria, más o menos tecnificado según la experiencia del laboratorio, y otro, el de las técnicas especiales para laboratorios de referencia y experimentados. En el primer grupo se encuadrarían las técnicas de detección directa convencionales, como la microscopía, junto otras más nuevas, como la microscopía fluorescente concentrada o las sondas de segunda generación y las técnicas de amplificación (PCR y similares) en centros con cierta experiencia. También se incluirían aquí los cultivos convencionales en medio sólido y los sistemas BACTEC® o ESP-II para el cultivo y el antibiograma de los fármacos de primera línea, igualmente limitados estos últimos a laboratorios experimentados. Por lo que concierne a la identificación, en este nivel tecnológico, además de los sistemas convencionales morfológicos y bioquímicos, podrían utilizarse las sondas genéticas.

En el segundo gran apartado, incluiríamos toda la tecnología disponible. Así, para el diagnóstico directo, las técnicas de microbiología molecular (PCR, sondas de segunda generación, etc.); para la identificación de especies, podríamos citar la cromatografía HPLC y la secuenciación del RNA; para la detección de resistencias, el estudio de las mutaciones, mediante técnicas del tipo PCR-SSCP u otras; y para estudios epidemiológicos debiéramos reservar técnicas como las de RFLP o el *spoligotyping*.

Como vemos, se trata de un gran número de técnicas a nuestro alcance, que deben ser bien utilizadas según las necesidades y las capacidades técnicas y experiencia de cada laboratorio. Por ello, es muy importante que estas técnicas sean sometidas a un correcto control de calidad, para un justo aprovechamiento de sus posibilidades, y no ser empleadas de manera arbitraria, por personal sin experiencia. En estas condiciones, pueden conducirnos a graves errores, como los detectados en los Estados Unidos en estos últimos años, donde se dio la voz de alarma sobre este tema. Hoy, más que nunca, cuando la oferta tecnológica es amplia, es cuando debemos situar todos los avances en su sitio apropiado, con criterios sensatos.

## BIBLIOGRAFIA

Butler WR, Jost HC, Kilburn JO. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. J Clin Microbiol 1991; 29:2468-2472.

Casal M. Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias. Universidad de Córdoba, Córdoba. 1991.

Casal M. Clinical Microbiology. Prous Science. Barcelona, 1998.

Salfinger M, Pfyffer GE. The new diagnostic mycobacterium laboratory. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13:961-979.

**Tabla 1. Microbiología de las enfermedades por micobacterias**

En un laboratorio convencional	En un laboratorio moderno con experiencia	En un laboratorio de referencia
A. Técnicas de diagnóstico		
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Microscopía (ZN o fluorescencia)</li> <li>● Cultivo en medio sólido (Löwenstein o Middlebrook)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Microscopía concentrada</li> <li>● Técnicas de amplificación (PCR o similar)</li> <li>● Sondas de segunda generación</li> <li>● Cultivo en medio líquido (Sistema Bactec) (Sistema Esp-II)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sólo para confirmar casos dudosos (técnicas de amplificación), o para el aislamiento de cultivos mixtos de más de una micobacteria</li> </ul>

<b>B. Técnicas de identificación</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Morfológicas</li> <li>● Bioquímicas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sondas genéticas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● HPLC</li> <li>● Secuenciación genética</li> </ul>
<b>C. Estudio de sensibilidad a los fármacos</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Método de las proporciones en medio sólido a fármacos de primera línea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Método de las proporciones</li> <li>● Bactec</li> <li>● Esp-II</li> <li>● Pirazinamida y fármacos de primera línea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Método de las proporciones</li> <li>● Bactec</li> <li>● Esp-II</li> <li>● Fármacos de segunda línea</li> <li>● Efecto post-antibiótico</li> <li>● Asociaciones de fármacos</li> </ul>
<b>D. Técnicas epidemiológicas</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>● No se realizan</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● No se realizan</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● RFLP</li> <li>● Spoligotyping</li> <li>● Micobacteriófagos</li> <li>● Micobacteriocinas</li> <li>● Micovariedades enzimáticas</li> </ul>

**Tabla 2. Niveles de laboratorios de microbiología clínica de la tuberculosis<sup>a</sup>**

<p><b>Laboratorios nivel I</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Almacén y distribución de material para toma de muestras.</li> <li>● Recogida de muestras en adecuadas condiciones.</li> <li>● Procesamiento de las muestras.</li> <li>● Visualización microscópica.</li> <li>● Envío de muestras a laboratorio nivel II.</li> <li>● Control bacteriológico de tratamientos.</li> <li>● Fichero abierto de enfermos.</li> <li>● Estadística bacteriológica.</li> </ul>
<p><b>Laboratorios nivel II</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Coordinación de laboratorios nivel I.</li> <li>● Adiestramiento de personal de nivel I y II.</li> <li>● Recepción de muestras.</li> <li>● Procesamiento de muestras</li> <li>● Visualización microscópica (ZN) (F).</li> <li>● Descontaminación siembra.</li> <li>● Envío correcto de cultivos a nivel III.</li> <li>● Pruebas preliminares de identificación.</li> <li>● Control bacteriológico de tratamientos.</li> <li>● Fichero abierto de enfermos.</li> <li>● Estadística bacteriológica de su zona.</li> <li>● Estudio de resistencia a antimicrobianos de 1<sup>a</sup> línea (casos clínicos).</li> </ul>

<sup>a</sup>Normalmente organizados en países donde existe un programa nacional de control de la tuberculosis

**Tabla 2. Continuación**

### **Laboratorios nivel III (Referencia)**

- Máxima autoridad técnica de la red.
- Actuar como nivel II de su zona y otras deficitarias.
- Centralizar la estadística bacteriológica.
- Estudios de resistencia a antimicrobianos (casos).
- Estudio de resistencia a fármacos (epidemiológicos).
- Estandarización de la sistemática a utilizar en laboratorios.
- Colección de cultivos (tipo y aislados clínicos).
- Decidir sobre material, reactivos y medios de cultivo a usar.
- Control de calidad de medios y reactivos usados.
- Formación de personal.
- Reuniones de trabajo con jefes de laboratorio.
- Fichero de enfermos.
- Conexión con laboratorios de la red.
- Conexión con las autoridades sanitarias correspondientes.
- Conexión con otros centros de referencia.
- Estudios piloto.
- Colaboración con otros centros de otros organismos.
- Mapa epidemiológico de micobacterias.
- Control de calidad de los laboratorios de la red.
- Centro de información bibliográfica y documentación.
- Elaboración de memorias anuales.
- Asesoramiento sobre técnicas.
- Investigaciones sobre el tema.
- Organización de reuniones científicas.

<sup>a</sup>Normalmente organizados en países donde existe un programa nacional de control de la tuberculosis.