

**UNIDAD DE REFERENCIA REGIONAL
DE MICOBACTERIAS**

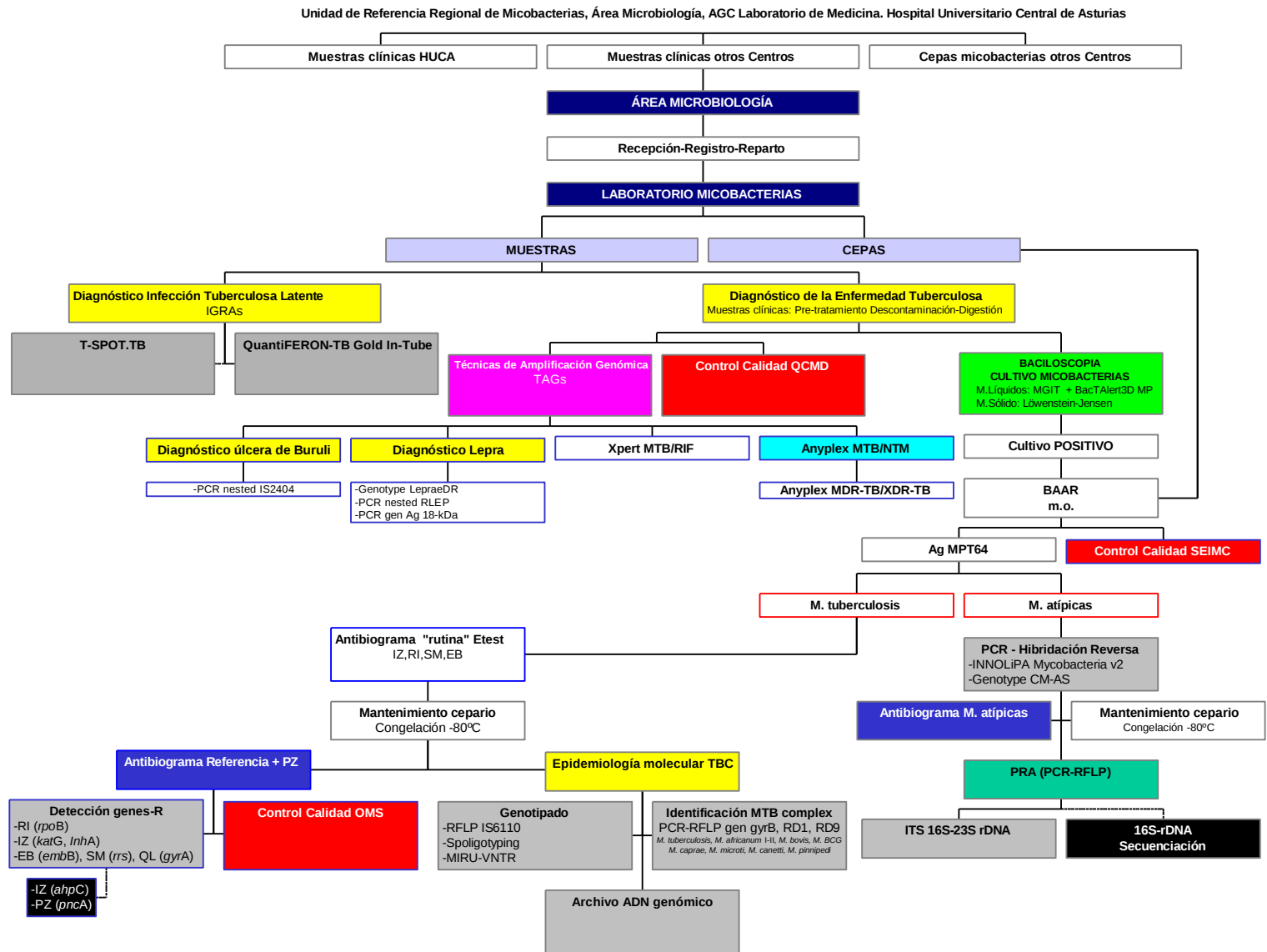
**ÁREA DE MICROBIOLOGÍA
AGC LABORATORIO DE MEDICINA**

**BIBLIOTECA DE PRUEBAS
ED02**

URM-AD	ALGORITMO DIAGNÓSTICO Unidad de Referencia Regional de Micobacterias
URM-A00	DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA mediante IGRA (<i>Interferon gamma release assays</i>)
URM-A01	QuantIFERON TB Gold In-Tube
URM-A02	T-SPOT.TB
URM-B00	DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD TUBERCULOSA
URM-B01	Examen microscópico
URM-B02	MYCOPREP Procedimiento de Descontaminación-Digestión
URM-B03	Cultivo de Micobacterias en medios líquidos y sólidos
URM-B03.1	Löwenstein-Jensen
URM-B03.2	Sistema Bactec MGIT 960 medio de cultivo BBL MGIT
URM-B03.3	Sistema Bact-Alert 3D medio de cultivo Bact-Alert MP
URM-B04	Diagnóstico de la tuberculosis mediante Técnicas de Amplificación Genómica
URM-B04.1	Xpert MTB/RIF
URM-B04.2	Anyplex MTB/NTM + Anyplex MDR-TB
URM-C00	PROCEDIMIENTOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS
URM-C01	Accuprobe MTB complex
URM-C02	SD BIOLINE TB Ag MPT64
URM-C03	INNOLiPA Mycobacteria V2
URM-C04	Genotype CM/AS
URM-C05	PRA (PCR-RFLP <i>hsp65</i> kDa)
URM-C06	ITS 16S-23S rDNA
URM-D00	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD <i>M. tuberculosis</i> complex
URM-D01	Métodos fenotípicos
URM-D01.1	Método de las Proporciones fármacos 1ª y 2ª línea
URM-D01.2	Método Etest
URM-D01.3	Pirazinamida, método de las Proporciones pH 5,5
URM-D02	Métodos genotípicos
URM-D02.1	INNOLiPA RIF/TB
URM-D02.2	Genotype MDRplus
URM-D02.3	Genotype MDRsl
URM-E00	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD <i>M. avium</i> complex
URM-E01	Microdilución claritromicina- <i>M. avium</i> complex
URM-E02	Etest fármacos 1ª y 2ª línea- <i>M. avium</i> complex
URM-F00	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD <i>M. kansasii</i>
URM-F01	Rifampicina, método de las Proporciones- <i>M. kansasii</i>
URM-F02	Etest fármacos 1ª y 2ª línea- <i>M. kansasii</i>
URM-G00	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD micobacterias de crecimiento rápido y otras micobacterias no tuberculosas
URM-G01	Microdilución fármacos seleccionados-Micobacterias crecimiento rápido
URM-G02	Etest fármacos 1ª, 2ª y 3ª línea-Micobacterias crecimiento rápido
URM-H00	EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS genotipificación cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
URM-H01	RFLP-IS6110
URM-H02	<i>Spoligotyping</i>
URM-H03	MIRU-VNTR

URM-H04	PCR-RFLP gen <i>gyrB</i>
URM-H05	PCR región RD1
URM-H06	PCR región RD9
URM-I00	DIAGNÓSTICO DE LA LEPROA (<i>M. leprae</i>)
URM-I01	Genotype LepraeDR
URM-I02	PCR Nested <i>M. leprae</i> -specific repetitive element (RLEP)
URM-I03	PCR Nested gen <i>Ag 18-kDa M. leprae</i>
URMJ00	DIAGNÓSTICO DE LA ÚLCERA DE BURULI (<i>M. ulcerans</i>)
URM-J01	PCR Nested IS2404 <i>M. ulcerans</i>

Laboratorio de Micobacterias. Algoritmo diagnóstico



URM-A00

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA mediante IGRA (*Interferon gamma release assays*)

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

La infección tuberculosa latente (ITL) es una dolencia asintomática e intransmisible que se produce por la persistencia de *M. tuberculosis* en el organismo de algunos individuos previamente expuestos que han sido infectados, la mayoría no desarrollarán la enfermedad pero un 5-10 % sufrirán tuberculosis meses o años más tarde. Existe un tratamiento específico para esta situación clínica. El principal objetivo del diagnóstico de la ITL, habitualmente en el contexto del estudio de contactos o bien previo a tratamiento con antiTNF α , será identificar clínicamente esta situación de cara a la instauración de la quimioprofilaxis.

Además de los criterios clínicos y radiológicos, clásicamente para el diagnóstico de la ITL se ha empleado la prueba de la tuberculina y desde hace unos años disponemos además de pruebas diagnósticas *in vitro*, que en el ámbito internacional se reconocen bajo el acrónimo de IGRA (*Interferon-gamma-release assays*), y que se realizan a partir de muestras de sangre heparinizada de los pacientes. Se basan en la detección por enzimoimmunoensayo del interferón-gamma (IFN- γ) liberado después de una estimulación con antígenos tuberculosos específicos ESAT-6 (*early-secreted antigenic target 6*), CFP-10 (*culture filtrate protein 10*) y TB7.7 (p4). En la actualidad existen dos formatos comercializados: QuantiFERON-TB Gold In-Tube[®] (Cellestis) y T-SPOT.TB[®] (Oxford Immunotec).

Los antígenos ESAT-6 y CFP 10 utilizados en estas pruebas derivan de la región RD1 del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* complex la cual no está presente en las cepas de *M. bovis* BCG por lo que en individuos vacunados con BCG los resultados obtenidos no se verán afectados (se pierde durante la derivación de *M. bovis* BCG de *M. bovis* entre 1908 y 1921 en el Instituto Pasteur). Esta región tampoco está presente en la mayoría de las micobacterias ambientales, con las excepciones de *M. kansasii*, *M. marinum*, y *M. szulgai* que podrían provocar reacciones cruzadas.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre anticoagulada con heparina.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Resultado IGRA Positivo (Infección tuberculosa)

Resultado IGRA Negativo (No evidencia de Infección tuberculosa)

BIBLIOGRAFÍA

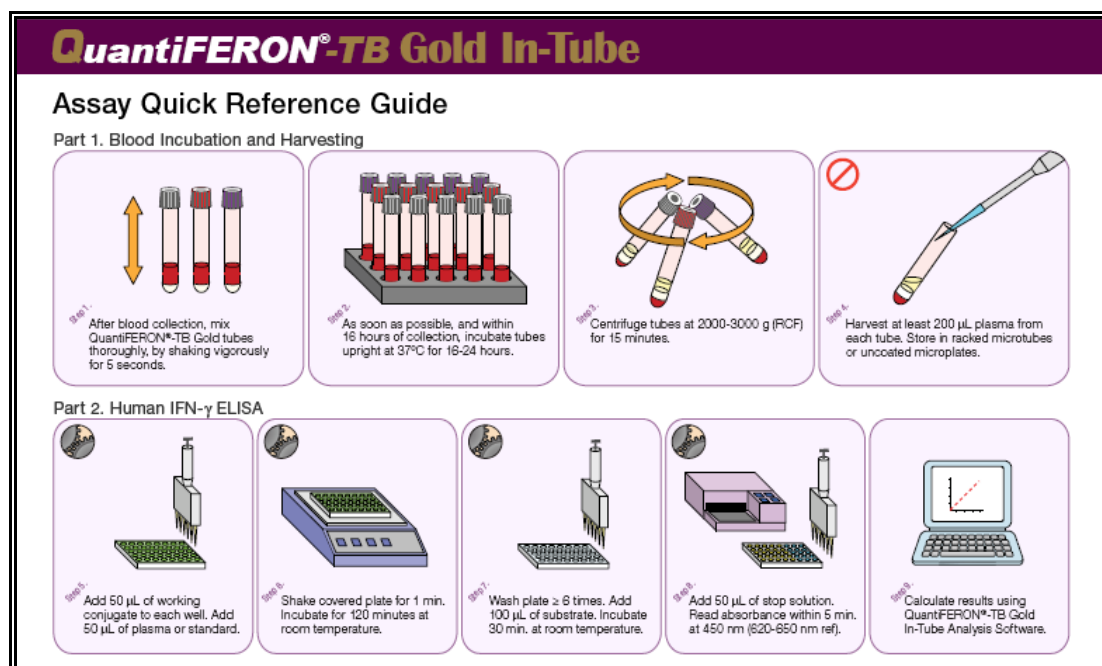
1. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. *Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis*. Chest. 2010 Apr; 137(4):952-68.
2. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AV. *Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells*. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Mar; 163(4):824-8.
3. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ, Reece WH, Latif M, Pasvol G, Hill AV. *Enhanced contact tracing and spatial tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells*. Lancet. 2001 Jun 23; 357(9273):2017-21.
4. Pai M, Zwerling A, Menzies D. *Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update*. Ann Intern Med. 2008 Aug 5; 149(3):177-84.

URM-A01

QuantIFERON TB Gold In-Tube®

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Este sistema emplea tres tubos específicos de recogida de sangre entera (1 ml de sangre para cada tubo), un tubo sirve como control negativo (NIL), un tubo que contiene los antígenos tuberculosos específicos (TB Antigen, tubo problema) y un tubo que contiene fitohemaglutinina (Mitogen, tubo control positivo). La sangre se extrae y se incuba entre 16 y 24h a 37°C, después se centrifugan a 3000 g durante 15 minutos, el plasma se retira y se mide la cantidad de interferón gamma mediante enzimoimmunoensayo, el resultado se expresa en UI/ml.



Esquema procedimiento QuantIFERON TB Gold In-Tube

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

3 ml de sangre (1 ml/tubo) recogida en 3 tubos diferentes (control positivo, control negativo, tubo problema) específicamente diseñados para esta prueba (*Nil*, *Antigen*, *Mitogen*) y que son facilitados por el laboratorio de micobacterias. Una vez extraída la sangre en los tubos, éstos deben voltearse unas 10 veces para que la sangre se mezcle con los reactivos contenidos en los tubos

La extracción de la muestra puede realizarse de lunes a jueves evitando las vísperas de festivos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Nil [IU/mL]	TB Antigen minus Nil [IU/mL]	Mitogen minus Nil [IU/mL] ¹	QuantiFERON®-TB [IU/mL]	Report/Interpretation
≤ 8.0	< 0.35	≥ 0.5	Negative	<i>M. tuberculosis</i> infection NOT likely
	≥ 0.35 and < 25% of Nil value	≥ 0.5		
	≥ 0.35 and ≥ 25% of Nil value	Any	Positive²	<i>M. tuberculosis</i> infection likely
	< 0.35	< 0.5	Indeterminate³	Results are indeterminate for TB-Antigen responsiveness
	≥ 0.35 and < 25% of Nil value	< 0.5		
> 8.0 ⁴	Any	Any		

QuantiFERON TB Gold In-Tube: Positivo (≥0.35 UI/ml)

QuantiFERON TB Gold In-Tube: Negativo

TIEMPOS DE RESPUESTA

2-7 días laborables

BIBLIOGRAFÍA

1. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. *Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis*. Chest. 2010 Apr; 137(4):952-68.
2. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AV. *Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells*. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Mar; 163(4):824-8.

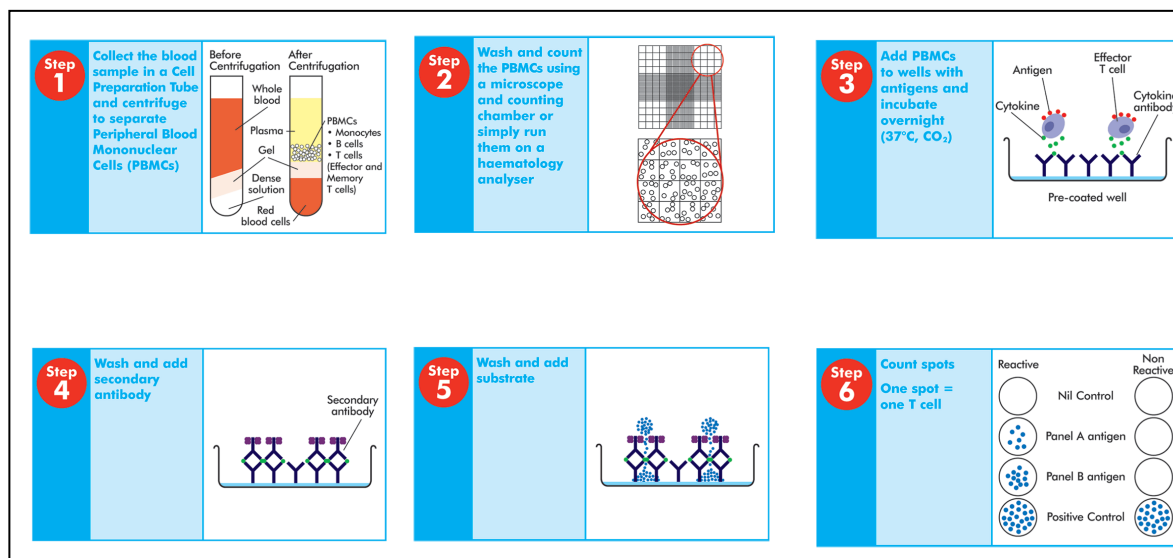
3. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ, Reece WH, Latif M, Pasvol G, Hill AV. *Enhanced contact tracing and spatial tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells*. Lancet. 2001 Jun 23; 357(9273):2017-21.
4. Pai M, Zwerling A, Menzies D. *Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update*. Ann Intern Med. 2008 Aug 5; 149(3):177-84.

URM-A02

T-SPOT.TB®

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Mide la cantidad de linfocitos T que liberan interferón gamma al ponerse en contacto con los antígenos tuberculosos específicos ya citados. Se diferencia de la prueba QuantiFERON TB Gold In-tube en que no se utiliza sangre total, sino que es necesario un proceso previo de separación y lavado de células mononucleares (se parte de 8 a 10 ml de sangre heparinizada). Las células mononucleares deben ajustarse a una cantidad de 250.000 células, posteriormente se incuban entre 16-24h a 37°C en presencia de CO₂, finalmente se mide la cantidad de interferón gamma liberado mediante enzimoimmunospot que se corresponderá con el número de manchas (*spots*) obtenidos en los pocillos problema.



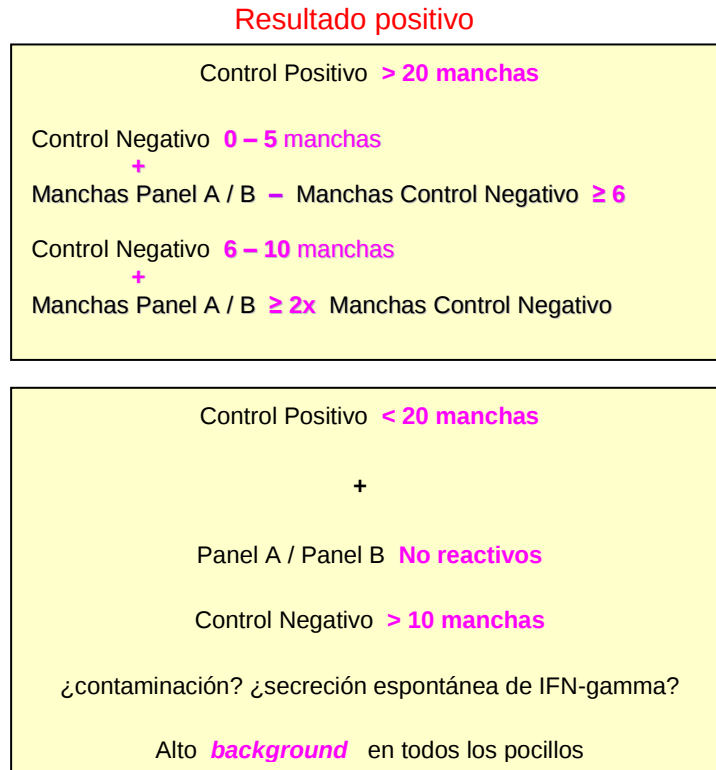
Esquema procedimiento T-SPOT.TB

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Pacientes >10 años: 8-10 ml de sangre anticoagulada con heparina; 4 ml cuando se trate de pacientes entre 2 a 9 años; y 2 ml en el caso de menores de 2 años.

Al tratarse de una prueba que no requiere urgencia, y por motivos de logística del laboratorio de micobacterias, la extracción de sangre para esta prueba SOLAMENTE SE REALIZARÁ LOS LUNES, evitando las vísperas de festivos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:



T-SPOT.TB Positivo (>6 manchas o spots)

T-SPOT.TB Negativo

TIEMPOS DE RESPUESTA

2 días laborables

BIBLIOGRAFÍA

1. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. *Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis*. Chest. 2010 Apr; 137(4):952-68.
2. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AV. *Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells*. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Mar; 163(4):824-8.
3. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ, Reece WH, Latif M, Pasvol G, Hill AV. *Enhanced contact tracing and spatial*

tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. Lancet. 2001 Jun 23; 357(9273):2017-21.

4. Pai M, Zwerling A, Menzies D. *Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update.* Ann Intern Med. 2008 Aug 5; 149(3):177-84.

URM-B00

DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD TUBERCULOSA

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Debemos diferenciar dos situaciones: 1) Diagnóstico de la infección tuberculosa latente, y 2) Diagnóstico de la enfermedad tuberculosa.

Diagnóstico de la infección tuberculosa latente: es una situación clínica que cursa sin sintomatología perceptible que se produce por la persistencia de *M. tuberculosis* en el organismo de individuos previamente expuestos que han sido infectados, la mayoría no desarrollarán la enfermedad pero un 5-10 % sufrirán tuberculosis meses o años más tarde.

Diagnóstico de la enfermedad tuberculosa: A su vez debemos diferenciar el diagnóstico clínico (clínica, radiología y/o anatomía patológica compatibles) que es un diagnóstico presuntivo, del diagnóstico microbiológico que es un diagnóstico etiológico definitivo ya que permite evidenciar la presencia del agente infeccioso específico: *Mycobacterium tuberculosis* complex.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

MUESTRAS: SELECCIÓN, RECOGIDA Y CONSERVACIÓN. Las muestras remitidas al laboratorio de Micobacterias deben cumplir una serie de condiciones generales de las que depende la calidad y eficiencia de los resultados microbiológicos: indicación correcta del estudio de micobacterias, selección de la muestra más representativa y rentable, recogida de forma estéril en cantidad suficiente y si es posible antes del inicio del tratamiento antimicobacteriano. No deben utilizarse fijadores ni sustancias conservantes. Tampoco es recomendable emplear escobillones, hisopos o torundas de algodón. Las muestras se deben recoger y enviar en contenedores estériles, de un solo uso y cierre hermético. Debe remitirse al laboratorio de manera inmediata (para evitar el crecimiento de la microbiota acompañante), de no ser posible, las muestras deben guardarse en frigorífico (2-8°C).

MUESTRA RESPIRATORIAS. El esputo es la muestra más frecuente y rentable. Debe recogerse por las mañanas, cuando existe una mayor concentración bacilar, y en ayunas. Son suficientes 3 muestras de 5-10 ml recogidas en días consecutivos. En caso de no conseguir una expectoración espontánea será necesario inducir el esputo mediante *clapping* o nebulizaciones de soluciones salinas.

De las muestras obtenidas por técnicas broncoscópicas (broncoaspirado, lavado broncoalveolar y cepillado bronquial con catéter telescópico) se deben enviar al menos 5 ml, teniendo en cuenta que deben procesarse lo antes posible ya que la lidocaína, anestésico utilizado frecuentemente en la broncoscopia, inhibe el crecimiento de las micobacterias.

El JUGO GÁSTRICO es una muestra indicada en niños o adultos en los cuales no es posible obtener una expectoración espontánea o inducida. Se realizará preferiblemente a primera hora de la mañana, en ayunas, ya que el peristaltismo intestinal limitaría la recuperación de bacilos.

LÍQUIDOS ESTÉRILES (cefalorraquídeo, pleural, articular, peritoneal, etc.), siempre debe recogerse el mayor volumen posible, ya que la carga bacilar en este tipo de muestras suele ser muy baja. En el caso de algunos líquidos (por ejemplo los articulares) la elevada cantidad de fibrina, habitualmente presente en los mismos, hace recomendable que sean recogidos en tubos con anticoagulante.

TEJIDOS (Biopsias). Debe evitarse la deshidratación de estas muestras una vez recogidas, por ello deben enviarse con una pequeña cantidad de suero fisiológico. NUNCA DEBE UTILIZARSE ALCOHOL O FORMALDEHÍDO ya que haría inviable la recuperación de las micobacterias. Las muestras de médula ósea deberían repartirse en dos tubos diferentes, uno con EDTA (para técnicas de PCR) y otro con heparina (para cultivo de micobacterias).

ORINA. Debe recogerse la muestra a primera hora de la mañana obtenida por micción espontánea, sonda urinaria o punción suprapúbica, siguiendo las indicaciones propias para la realización de urinocultivos. Es aconsejable recoger tres muestras durante días consecutivos.

HECES. Se recomienda el estudio de tres muestras de aproximadamente 1 g cada una. Su envío al laboratorio debe ser inmediato

La información clínica siempre debería de aparecer reflejada en los formularios de petición al Laboratorio de Micobacterias, ya que en permitirá establecer prioridades de manera eficaz y determinar la secuencia diagnóstica más adecuada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Drobniewski FA, Hoffner S, Rusch-Gerdes S, Skenders G, Thomsen V; WHO European Laboratory Strengthening Task Force. *Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe*. Eur Respir J. 2006 Nov; 28(5):903-9.
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-B01

EXAMEN MICROSCÓPICO

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

A pesar de que en los últimos años la micobacteriología ha experimentado importantes avances tecnológicos, el diagnóstico precoz de la tuberculosis en el laboratorio sigue recayendo en el examen microscópico (Baciloscopia) de las muestras clínicas teñidas de manera adecuada. En la actualidad, es el procedimiento más simple, más barato y más rápido para proporcionar al clínico una orientación diagnóstica preliminar. El examen microscópico permite valorar la calidad de los especímenes clínicos recibidos, identifica los pacientes más contagiosos y además resulta útil para monitorizar la respuesta de los pacientes al tratamiento antimicobacteriano.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Las micobacterias son difíciles de teñir. La pared celular de las micobacterias contiene ácidos grasos de cadena larga (ácidos micólicos) lo que les confiere un revestimiento impermeable a los colorantes básicos habituales. Para lograr la penetración del colorante primario (fucsina o fluorocromos) al interior de la micobacteria deberemos recurrir al calor o a los detergentes. Una vez dentro no podrá ser extraído con los decolorantes habituales. Esta propiedad se denomina ácido-alcohol resistencia (AAR) y es útil para la identificación de este grupo específico de bacterias.

Métodos para determinar la AAR en un organismo: Unos métodos emplean como colorante primario carbol fucsina que tiñe de rojo los organismos que son AAR, el procedimiento fue originalmente descrito por Ziehl y Neelsen y ha experimentado numerosas modificaciones (la tinción de Kinyoun es una de las más usadas). Otros métodos utilizan como colorante primario fluorocromos (auramina O, auramina-rodamina) con ellos los organismos que son AAR aparecen fluorescentes de color amarillo o naranja dependiendo del filtro empleado.

La AAR no es específica del género *Mycobacterium*, existen otros microorganismos que pueden presentar grados diferentes de AAR como son: *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordona*, *Legionella micdadei* y los ooquistes de *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Sarcocystis* y *Cyclospora*.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Las muestra remitidas al laboratorio deben cumplir una serie de condiciones generales de las que depende la calidad y eficiencia de los resultados microbiológicos: indicación correcta del estudio de micobacterias, selección de la muestra más representativa, y rentable, recogida de forma estéril en cantidad suficiente, y si es posible antes del inicio del tratamiento antimicobacteriano. No deben utilizarse fijadores ni sustancias conservantes. Tampoco es recomendable emplear escobillones, hisopos o torundas de algodón. Las muestras se deben recoger y enviar en contenedores estériles de un solo uso y con cierre hermético.

Las muestras que no vayan a ser remitidas de manera inmediata al laboratorio deberán guardarse refrigeradas 2-8°C.

Cualquier tipo de material clínico puede contener micobacterias, por lo que cualquier espécimen es susceptible de ser visualizado al microscopio.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Informe Baciloscopia	Recuento BAAR observados
NEGATIVO	0
POSITIVO	1-9 / 300 campos
POSITIVO	1-9 / 100 campos
POSITIVO	1-9 / 10 campos
POSITIVO	1-9 / campo
POSITIVO	>9 / campo

TIEMPOS DE RESPUESTA:

-Peticiónes urgentes sobre muestra directa: 1 hora

-Muestras homogeneizadas: 1 día

BIBLIOGRAFÍA

1. Pfyffer G.E. and Palicova F. 2011. *Mycobacterium: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures*, en: Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. ASM Press, Washington D.C.
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias* 9a. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005
3. Ebersole L.L. 1995. *Acid-fast stain procedures*, p. 3.5.1-3.5.11, en: R.N. Master (ed.), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed., ASM Press, Washington D.C.
4. Drobniewski F.A., M. Caws, A Gibson, and D. Young. *Modern laboratory diagnosis of tuberculosis*, Lancet Infect. Dis. 2003, 3: 141-147
5. Drobniewski FA, Hoffner S, Rüscher-Gerdes S, Skenders G, Thomsen V; WHO European Laboratory Strengthening Task Force. *Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe*. Eur Respir J. 2006 Nov; 28(5):903-9.

URM-B02

MYCOPREP[®], PROCEDIMIENTO DE DESCONTAMINACIÓN-DIGESTIÓN

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

La mayoría de muestras clínicas remitidas al laboratorio para descartar micobacterias proceden de zonas no estériles del organismo. Los especímenes suelen consistir en una compleja matriz orgánica contaminada con una gran variedad de microorganismos. Si a esto se une el largo período de incubación que requieren los cultivos de micobacterias, es altamente probable que el crecimiento micobacteriano pueda verse dificultado o incluso enmascarado por la presencia de estos microorganismos. Por todo ello, es necesario recurrir a un pretratamiento adecuado de las muestras (homogeneización, descontaminación y concentración) antes de ser depositadas en los medios de cultivo. La concentración de las muestras mejora la detección de micobacterias tanto en el examen microscópico como en el cultivo. En el caso de los fluidos corporales estériles, que suelen contener pequeñas cantidades de micobacterias, es necesario concentrarlos al máximo por centrifugación antes de inocular los medios de cultivo.

La descontaminación sólo tiene sentido cuando se piensa que el espécimen está contaminado, por lo tanto los líquidos orgánicos estériles y los tejidos recogidos asépticamente no la precisan. En principio, un procedimiento de descontaminación debería ser capaz de eliminar los contaminantes en la medida de lo posible sin afectar seriamente la viabilidad de las micobacterias (todos los métodos actuales son tóxicos en algún grado para las micobacterias). La digestión permite la homogeneización de la muestra ya que algunos especímenes, en particular los esputos, contienen moco que sino es licuado proporciona a las bacterias contaminantes una barrera de protección frente a la acción de los agentes descontaminantes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Existen numerosos protocolos de descontaminación recogidos en la literatura: método de Petroff (hidróxido sódico), método de Kubica-Krasnow (cisteína y cloruro de benzalconio), método de Tacquet y Tison (hidróxido sódico y laurilsulfato de sodio) entre otros. Algunos de ellos utilizan un mismo reactivo para digerir y descontaminar, mientras que otros usan reactivos diferentes para cada uno de los procedimientos. No existe un método ideal que sirva para todos los especímenes clínicos, para todos los laboratorios y para todas las circunstancias.

El hidróxido sódico es el agente descontaminante más empleado, tiene además propiedades mucolíticas. A pesar de que las micobacterias son más resistentes a las bases fuertes que otros microorganismos, debe ser manejado con cuidado ya que las micobacterias también son susceptibles a sus efectos. Al tratarse de un álcali muy potente resulta crítica la concentración empleada, así como el tiempo de actuación. Una descontaminación agresiva matará del orden del 20 a 90% de las micobacterias presentes en una muestra clínica. La N-acetil-L-cisteína es la sustancia mucolítica que más se utiliza, a pesar de que no tiene efecto inhibitorio directo sobre las bacterias cuando se usa combinada permite trabajar con concentraciones más bajas de hidróxido sódico. La combinación N-acetil-L-cisteína

+ NaOH al 2% es el método de descontaminación-digestión más ampliamente difundido.

En la Unidad de Referencia Regional de Micobacterias del HUCA el Procedimiento de Descontaminación/Digestión se lleva a cabo mediante el kit comercial BBL Mycoprep (*Specimen Digestion/Descontamination KIT*).

Reactivo BBL MycoPrep

Fórmula aproximada por litro de agua purificada

NaOH 20,0 g

Citra trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 14,5 g

Cada ampolla de vidrio sellada dentro del frasco contiene un mínimo de 0,370 g de NALC ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$).

Tampón fosfato BBL MycoPrep

Fórmula aproximada* por 500 mL de agua purificada

Fosfato disódico (Na_2HPO_4) 2,37 g

Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 2,27 g

pH final de 6,8

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Las muestras remitidas al laboratorio deben cumplir las condiciones generales de las que depende la calidad y eficiencia de los resultados microbiológicos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS: No procede.

Si los procedimientos se siguen correctamente, se licuarán las muestras viscosas y se reducirá o eliminará la contaminación por la microbiota (flora normal).

TIEMPOS DE RESPUESTA: No procede.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pfyffer G.E. and Palicova F. 2011. *Mycobacterium: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures*, en: Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed. ASM Press, Washington D.C.
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005
3. Cernoch P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. *Cumitech 16^a, Laboratory diagnosis of mycobacterioses*. A.S. Weissfeld (Coordinating ed.). ASM Press, Washington D.C.

URM-B03

CULTIVO DE MICOBACTERIAS EN MEDIOS LÍQUIDOS Y SÓLIDOS

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

El aislamiento de micobacterias a partir del cultivo de muestras clínicas continúa siendo fundamental para el diagnóstico específico de las infecciones por estos microorganismos. El cultivo ha demostrado ser más sensible (10^1 - 10^2 bacterias viables/ml) que el examen microscópico. Además, el aislamiento del agente causal permite la identificación de la especie, los posteriores estudios de sensibilidad frente a los antimicrobianos, la monitorización de la efectividad del tratamiento, y la genotipificación de cepas.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Las micobacterias suelen ser bastante exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales. Los medios de cultivo se pueden dividir en dos grupos básicos: medios con huevo o con agar.

Medios sólidos con huevo. Son medios ricos que contienen huevo (entero o sólo yema), fécula de patata, sales, glicerol y un agente inhibidor como es el verde de malaquita. Las ventajas fundamentales radican en la buena recuperación de gran parte de las especies micobacterianas y su buena capacidad tanto, inhibidora de la flora contaminante, como tamponante que permite neutralizar múltiples productos tóxicos presentes en las muestras clínicas, así como algunos restos de diversos productos descontaminantes. Además, poseen una vida media prolongada cuando se conservan a 2-8 °C (6 meses). También presentan, a veces, algunos problemas para distinguir entre los restos del inóculo y el crecimiento micobacteriano. Por último, cuando se contaminan se afecta todo el medio pudiendo llegar a licuarse.

Medios sólidos con agar. Los empleados en la URM son los medios sintéticos tipo Middlebrook 7H10 y 7H11. Son transparentes y permiten una detección rápida del crecimiento micobacteriano que puede distinguirse de los residuos de la muestra en la siembra. Además se pueden utilizar para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. La inclusión de un 2% de glicerol permite un mejor crecimiento del complejo *M. avium-intracellulare*. El medio 7H11 contiene un 0,1% de hidrolizado de caseína que favorece la recuperación de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la isoniácida. El almacenaje es delicado ya que el exceso de temperatura o la exposición a la luz puede deteriorar el medio y estimular la producción de formaldehído que resulta tóxico para las micobacterias. La vida media es más corta 1 mes a 2-8°C.

Medios líquidos. En general, son medios muy enriquecidos que recuperan un mayor número de micobacterias, y más rápidamente que los medios sólidos. Aparte de los clásicos Middlebrook 7H9, Dubos, Youmans, Proskauer-Beck, etc., existen una serie de sistemas comerciales que, utilizando la base de los convencionales incorporan sistemas totalmente automatizados de incubación y lectura.

En la Unidad de Referencia Regional de Micobacterias del HUCA para el aislamiento primario a partir de muestras clínicas se emplea una combinación de

medios líquidos (sistemas BactAlert 3D® y Bactec MGIT 960®) y sólidos (Löwenstein-Jensen).

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Las muestras remitidas al laboratorio deben cumplir las condiciones generales comentadas anteriormente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pfyffer G.E. and Palicova F. 2011. *Mycobacterium: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures*, en: Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. ASM Press, Washington D.C.
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005
3. Salfinger M., G.E. Pfyffer. *The new diagnostic mycobacteriology laboratory*, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1994, 13: 961-979
4. Drobniowski F.A., M. Caws, A Gibson, and D. Young. *Modern laboratory diagnosis of tuberculosis*, Lancet Infect. Dis. 2003, 3: 141-147
5. Cernoch P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16^a, *Laboratory diagnosis of mycobacterioses*. A.S. Weissfeld (Coordinating ed.). ASM Press, Washington D.C.

URM-B03.1

LÖWENSTEIN-JENSEN

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

El medio sólido de Löwenstein-Jensen es un medio a base de huevo, fécula de patata, glicerol y sales, solidificado por calentamiento de 85° a 95 °C durante 30-45 min. La mayoría de micobacterias crecen bien en Löwenstein-Jensen, este medio resiste muy bien la desecación durante bastante tiempo, lo que conlleva caducidades largas, e incorpora verde de malaquita en concentraciones que dificultan el crecimiento de otros microorganismos no deseados.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Las muestras remitidas al laboratorio deben cumplir las condiciones generales comentadas anteriormente.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Cultivo de Micobacterias: Positivo (se aíslan bacilos ácido-alcohol resistentes)

Cultivo de Micobacterias: Negativo

TIEMPOS DE RESPUESTA

Todos los cultivos son incubados durante un mínimo de 8 semanas, antes de considerarlos negativos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pfyffer G.E. and Palicova F. 2011. *Mycobacterium: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures*, en: Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed. ASM Press, Washington D.C.
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005
3. Salfinger M., G.E. Pfyffer. *The new diagnostic mycobacteriology laboratory*, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1994, 13: 961-979
4. Drobniewski F.A., M. Caws, A Gibson, and D. Young. *Modern laboratory diagnosis of tuberculosis*, Lancet Infect. Dis. 2003, 3: 141-147
5. Cernoch P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. *Cumitech 16^a, Laboratory diagnosis of mycobacterioses*. A.S. Weissfeld (Coordinating ed.). ASM Press, Washington D.C.

URM-B03.2

SISTEMA BACTEC MGIT 960[®], medio de cultivo BBL MGIT[®]

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

El tubo MGIT (indicador de crecimiento micobacteriano) contiene 7 mL de base de Caldo Middlebrook 7H9 modificado. Los tubos deben suplementarse inmediatamente antes de su uso con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) y la mezcla antibiótica denominada PANTA (polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima, azlocilina). Este medio es apto para todo tipo de muestras clínicas, tanto pulmonares como extra-pulmonares, excepto sangre y orina. Los tubos inoculados se colocan en el incubador-lector para el control continuo hasta obtener una lectura positiva o hasta el final del procedimiento de análisis.

El suplemento OADC se añade con la finalidad de proporcionar nutrientes esenciales para el crecimiento rápido de las micobacterias. El ácido desempeña un papel importante en el metabolismo micobacteriano. La albúmina actúa como agente protector al ligar ácidos grasos libres, los cuales pueden ser tóxicos para las especies *Mycobacterium*. La dextrosa es una fuente de energía. La catalasa

destruye las peroxidasas tóxicas que pueden estar presentes en el medio. La microbiota acompañante se reduce al añadir PANTA al caldo base.

Los tubos, de fondo redondo, llevan incorporado en su parte inferior-interna, un compuesto fluorescente incluido en silicona. El compuesto fluorescente es sensible a la presencia de oxígeno disuelto en el caldo. Inicialmente, la gran cantidad de oxígeno disuelto apaga las emisiones procedentes del compuesto y se puede detectar muy poca fluorescencia. Más tarde, los microorganismos que respiran activamente consumen el oxígeno y permiten que se detecte la fluorescencia. Los tubos que se introducen en el instrumento BACTEC MGIT son incubados continuamente a 37°C y éste controla los tubos cada 60 minutos para detectar un aumento en la fluorescencia. El análisis de la fluorescencia se utiliza para determinar si el instrumento detecta el tubo como positivo, es decir, que la muestra analizada contiene organismos viables. Cada tubo que el instrumento detecta como positivo contiene aproximadamente 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Los frascos de cultivo que permanecen negativos durante un mínimo de 42 días y que no muestran indicios de ser positivos se retiran del instrumento como negativos.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Las muestras remitidas al laboratorio deben cumplir las condiciones generales comentadas anteriormente.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Cultivo de Micobacterias: Positivo (se aíslan bacilos ácido-alcohol resistentes)

Cultivo de Micobacterias: Negativo

TIEMPOS DE RESPUESTA

Todos la muestra son incubadas durante un mínimo de 6 semanas antes de considerarlas negativas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pfyffer G.E. and Palicova F. 2011. *Mycobacterium: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures*, en: Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed. ASM Press, Washington D.C.
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias* 9a. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005
3. Salfinger M., G.E. Pfyffer. *The new diagnostic mycobacteriology laboratory*, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1994, 13: 961-979
4. Drobniewski F.A., M. Caws, A Gibson, and D. Young. *Modern laboratory diagnosis of tuberculosis*, Lancet Infect. Dis. 2003, 3: 141-147

5. Cernoch P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16^a, *Laboratory diagnosis of mycobacterioses*. A.S. Weissfeld (Coordinating ed.). ASM Press, Washington D.C.

URM-B03.3

SISTEMA BacTAlert 3D[®], medio de cultivo BacTAlert MP[®]

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

El sistema BacT/ALERT 3D consta de un frasco de cultivo específico y de un armario-incubador que incorpora un sistema de lectura automatizada. Está diseñado para la recuperación y detección de micobacterias en muestras clínicas estériles no hemáticas, y en muestras no estériles tras el procedimiento de descontaminación-digestión.

La formulación del medio de cultivo (BacT/ALERT MP) incluye: caldo de Middlebrook 7H9 modificado, digerido pancreático de caseína, seroalbúmina bovina y catalasa en agua purificada. Los frascos contienen 10 ml de medio de cultivo, y se preparan con una atmósfera de CO₂, nitrógeno y oxígeno. El suplemento liofilizado contiene antibióticos (anfotericina B, azlocilina, ácido nalidíxico, polimixina B, trimetoprima, vancomicina), ácido oleico, glicerol, amaranto y seroalbúmina bovina en agua purificada.

El sistema BacTAlert 3D detecta el crecimiento de las micobacterias a través de un sensor colorimétrico (permeable al CO₂) y la luz reflejada por el mismo. El metabolismo propio de las bacterias al utilizar los sustratos presentes en el medio de cultivo generará como producto dióxido de carbono. Este CO₂ hará que el detector instalado en el fondo de cada frasco cambie a un color más claro o amarillo. Los cambios graduales de color provocarán un aumento de las unidades de reflectancia controladas por el sistema, y cuando se sobrepase un umbral determinado alertará al usuario de la existencia de un resultado positivo. El periodo de incubación recomendado en este sistema son 42 días. Durante todo ese tiempo, el instrumento controla y registra la reflectancia de todos los cultivos cada 10 minutos. Cuando se detecta un positivo, la densidad de microorganismos suele ser del orden de 10⁶ – 10⁷ unidades formadoras de colonias (UFC).

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Las muestras remitidas al laboratorio deben cumplir las condiciones generales comentadas anteriormente.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Cultivo de Micobacterias: Positivo (se aíslan bacilos ácido-alcohol resistentes)

Cultivo de Micobacterias: Negativo

TIEMPOS DE RESPUESTA

Todos la muestra son incubadas durante un mínimo de 6 semanas antes de considerarlas negativas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pfyffer G.E. and Palicova F. 2011. *Mycobacterium: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures*, en: Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed. ASM Press, Washington D.C.
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias* 9a. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005
3. Salfinger M., G.E. Pfyffer. *The new diagnostic mycobacteriology laboratory*, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1994, 13: 961-979
4. Drobniewski F.A., M. Caws, A Gibson, and D. Young. *Modern laboratory diagnosis of tuberculosis*, Lancet Infect. Dis. 2003, 3: 141-147
5. Cernoch P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16^a, *Laboratory diagnosis of mycobacterioses*. A.S. Weissfeld (Coordinating ed.). ASM Press, Washington D.C.

URM-B04

DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS MEDIANTE TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN GENÓMICA

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Las técnicas de amplificación genómica (TAG), permiten detectar la presencia de *M. tuberculosis* complex directamente en la muestra clínica. Son técnicas rápidas, reproducibles y altamente sensibles en las que un fragmento específico de ácidos nucleicos, presente en mayor o menor cantidad en la muestra clínica, es utilizado como molde para la síntesis enzimática *in vitro* de nuevas copias de esa secuencia diana hasta unos niveles que la hagan detectable. Todas las TAG constan de tres fases: extracción de los ácidos nucleicos, amplificación y detección del producto amplificado. La amplificación puede lograrse de diferentes formas, las más utilizadas son las conocidas como: PCR (*Polymerase Chain Reaction*); TMA (*Transcription-Mediated Amplification*); LCR (*Ligase Chain Reaction*); y SDA (*Strand Displacement Amplification*); y más recientemente PCR en tiempo real (*Real-time PCR*). Globalmente, los estudios evidencian una buena sensibilidad (90-100%) en muestras respiratorias con examen microscópico positivo. Sin embargo, aunque varía según la serie, la sensibilidad es baja o muy baja en muestras con examen microscópico negativo y en muestras de origen extra-pulmonar. Se recomienda incorporar las TAG a la rutina diagnóstica en todos los casos de alta sospecha de tuberculosis. Los resultados deben interpretarse siempre en el contexto clínico de cada paciente. Un resultado negativo no descarta tuberculosis. Es importante recordar que las TAG pueden detectar material genético de organismos no viables, por ello no están indicadas para el control del tratamiento. La mayoría de las TAG

actualmente comercializadas no detectan micobacterias atípicas, sólo detectan *M. tuberculosis* complex, por lo que no sirven para diagnosticar micobacteriosis. Este tipo de tecnología complementa a la existente actualmente y no sustituye a ninguno de los procedimientos tradicionales.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Las muestras remitidas al laboratorio deben cumplir las condiciones generales comentadas anteriormente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pfyffer G.E. and Palicova F. 2011. *Mycobacterium: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures*, en: Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. ASM Press, Washington D.C.
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005
3. Drobniewski F.A., M. Caws, A Gibson, and D. Young. *Modern laboratory diagnosis of tuberculosis*, Lancet Infect. Dis. 2003, 3: 141-147
4. Drobniewski FA, Hoffner S, Rusch-Gerdes S, Skenders G, Thomsen V; WHO European Laboratory Strengthening Task Force. *Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe*. Eur Respir J. 2006 Nov; 28(5):903-9.

URM-B04.1

XPert MTB/RIF®

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

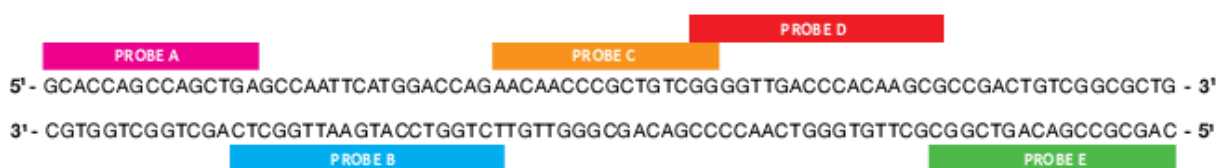
La prueba Xpert MTB/RIF, que se usa con el sistema Cepheid GeneXpert®, consiste en una PCR semicuantitativa, integrada y en tiempo real, que se utiliza para: 1) la detección de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas; y 2) la detección de mutaciones asociadas a la resistencia a la rifampicina del gen *rpoB* en muestras de pacientes susceptibles de presentar resistencia a la rifampicina. La prueba MTB/RIF está pensada para usarse con muestras de pacientes no tratados que presentan indicios clínicos de padecer tuberculosis (TB). El uso de Xpert MTB/RIF para la detección de *M. tuberculosis* (MTB) o la determinación de la resistencia a la rifampicina no ha sido validado para pacientes que estén recibiendo tratamiento para la tuberculosis.

El ensayo Xpert MTB/RIF incluye reactivos para la detección de la tuberculosis y la resistencia a RIF, así como un control de procesamiento de muestra para controlar el adecuado procesamiento de las bacterias diana y para supervisar la presencia de inhibidores en la PCR. Mediante la función de comprobación de sonda, se comprueba la rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de RCP en el

cartucho, la integridad de la sonda y la estabilidad del fluorocromo. Los iniciadores del ensayo Xpert MTB/RIF amplifican una porción del gen *rpoB* que contiene la región "central" de 81 pares de bases. Las sondas son capaces de distinguir entre la secuencia salvaje conservada y las mutaciones de la región central que se asocian a la resistencia a RIF.



rpoB GENE 81 bp RIF RESISTANCE DETERMINING REGION



REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Las muestras remitidas al laboratorio deben cumplir las condiciones generales comentadas anteriormente.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Detección genoma *M. tuberculosis* complex: Positivo

Detección genoma *M. tuberculosis* complex: Negativo

TIEMPOS DE RESPUESTA

1-2 días laborables.

BIBLIOGRAFÍA

1. Boehme CC, Nabeta P, Hilleman D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, Allen J, Tahirli R, Blakemore R, Rustomjee R, Milovic A, Jones M, O'Brien SM, Persing DH, Rusch Gerdes S, Gotuzzo E, Rodrigues C, Alland D, Perkins MD. *Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance*. N Engl J Med. 2010 Sep 9; 363(11):1005-15.
2. Drobniewski FA, Hoffner S, Rusch-Gerdes S, Skenders G, Thomsen V; WHO European Laboratory Strengthening Task Force. *Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe*. Eur Respir J. 2006 Nov; 28(5):903-9.
3. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

4. World Health Organization (WHO). *Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR.TB): recommendations for prevention and control*. Weekly Epidemiol Record 2006; 81: 430-432.

URM-B04.2

ANYPLEX MTB/NTM[®] + ANYPLEX MDR-TB/ XDR-TB[®]

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Sistema multiplex de PCR en tiempo real para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* complex y micobacterias no-tuberculosas (*Mycobacterium spp*). En un segundo tiempo, en el caso de las muestras *M. tuberculosis* positivas, se puede detectar además la resistencia a Isoniacida, Rifampicina, Etambutol, Quinolonas, y Aminogucósidos.

La diana elegida para detectar *M. tuberculosis* complex es una región conservada del gen IS6110 y del gen MPB64. Para detectar género *Mycobacterium* la diana es una secuencia conservada del gen 16S rRNA.

Anyplex II MDR-TB/XDR-TB point mutations

Target mutations of MDR-TB detection						
Drug	Related gene	Mutation				
RIF-R* (18 mutations)	<i>rpoB</i>	L511P (CTG→CCG)	3 a.a. deletion in 513~516	S522Q (TCG→CAG)	H526N (CAC→AAC)	S531W (TCG→TGG)
		Q513K (CAA→AAA)	D516V (GAC→GTC)	H526C (CAC→TGC)	H526R (CAC→CGC)	L533P (CTG→CCG)
		Q513L (CAA→CTA)	D516Y (GAC→TAC)	H526D (CAC→GAC)	H526Y (CAC→TAC)	
		Q513P (CAA→CCA)	S522L (TCG→TTG)	H526L (CAC→CTC)	S531L (TCG→TTG)	
INH-R (7 mutations)	<i>katG</i>	S315I (AGC→ATC)	S315N (AGC→AAC)	S315T (AGC→ACC)	S315T (AGC→ACA)	
	<i>inhA</i> promoter	-15 (C→T)	-8 (T→A)	-8 (T→C)		

* It is possible to detect 9 additional RIF resistance mutations, which have same codon site.

Target mutations of XDR-TB detection						
Drug	Related gene	Mutation				
FQ-R (7 mutations)	<i>gyrA</i>	A90V (CCG→GTG) S91P (TCG→CCG)	D94A (GAC→GCC) D94G (GAC→GGC)	D94H (GAC→CAC)	D94N (GAC→AAC)	D94Y (GAC→TAC)
Injectable drug-R (6 mutations)	<i>rrs</i>	1401 (A→G)	1402 (C→T)	1484 (G→T)		
	<i>eis</i> promoter	-37 (G→T)	-14 (C→T)	-10 (G→A)		

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Las muestras remitidas al laboratorio deben cumplir las condiciones generales comentadas anteriormente.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Detección genoma *M. tuberculosis* complex: Positivo

Detección genoma *M. tuberculosis* complex: Negativo

TIEMPOS DE RESPUESTA

1-5 días laborables.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization (WHO). *Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR.TB): recommendations for prevention and control*. Weekly Epidemiol Record 2006; 81: 430-432.
2. Drobniewski FA, Hoffner S, Rusch-Gerdes S, Skenders G, Thomsen V; WHO European Laboratory Strengthening Task Force. *Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe*. Eur Respir J. 2006 Nov; 28(5):903-9.
3. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005
4. Drobniewski F.A., M. Caws, A Gibson, and D. Young. *Modern laboratory diagnosis of tuberculosis*, Lancet Infect. Dis. 2003, 3: 141-147

URM-C00

PROCEDIMIENTOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

La identificación de las especies que forman parte del género *Mycobacterium*, clásicamente ha estado basada en el análisis de los resultados obtenidos de un número muy limitado de características fenotípicas (morfología, pruebas bioquímicas, velocidad de crecimiento). Esta metodología de trabajo es lenta, subjetiva en cuanto a la interpretación de algunos resultados y puede llevar a errores en la identificación. *M. tuberculosis* complex y *M. leprae* son las especies con más relevancia desde el punto de vista clínico ya que son especies patógenas.

Al resto de especies se las ha denominado de diferentes formas: micobacterias atípicas, micobacterias no tuberculosas, micobacterias diferentes a las tuberculosas, micobacterias ambientales, micobacterias oportunistas. En la actualidad sigue sin existir acuerdo en una denominación única. Se encuentran en el ambiente: agua (incluida agua del grifo), suelo, polvo, leche, alimentos, aves y otros animales. La significación clínica del aislamiento dependerá del tipo de espécimen, del número de aislamientos, del grado de crecimiento y de la especie identificada. Por supuesto también dependerá del contexto clínico de los pacientes, sirvan como ejemplo la inmunodepresión o la existencia de patología pulmonar crónica. El número de especies es muy elevado, y crece a medida que los medios de cultivo e identificación mejoran, sin embargo muy a menudo solamente un número limitado de especies producen enfermedad, y entre ellas se encuentran: *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. mageritense*, *M. xenopi*, *M. avium* complex, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. celatum*, *M. asiaticum*, *M. szulgai*.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Bacilos ácido-alcohol resistentes aislados en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pfyffer G.E. and Palicova F. 2011. *Mycobacterium: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures*, en: Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. ASM Press, Washington D.C.
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005
3. Drobniewski F.A., M. Caws, A Gibson, and D. Young. *Modern laboratory diagnosis of tuberculosis*, Lancet Infect. Dis. 2003, 3: 141-147
4. Drobniewski FA, Hoffner S, Rusch-Gerdes S, Skenders G, Thomsen V; WHO European Laboratory Strengthening Task Force. *Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe*. Eur Respir J. 2006 Nov; 28(5):903-9.

URM-C01

ACCUPROBE® *M. tuberculosis* complex

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

La prueba AccuProbe se utiliza para identificar *Mycobacterium tuberculosis* complex a partir de los cultivos. Emplea sondas de DNA específicas marcadas con ésteres de acridina. Se basa en una hibridación de ácidos nucleicos en formato tubo que se revela por reacción de quimioluminiscencia. Los resultados son interpretados en función de un valor umbral (≥ 30000 RLU, en lector AccuLDR Leader), las muestras que producen una señal luminosa de valor igual o superior al mismo, son consideradas positivas.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Bacilos ácido-alcohol resistentes aislados en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Se identifica: *Mycobacterium tuberculosis* complex

TIEMPOS DE RESPUESTA

Desde 1-2 días laborables desde la positividad de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pfyffer G.E. and Palicova F. 2011. *Mycobacterium: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures*, en: Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed. ASM Press, Washington D.C.
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005
3. Drobniewski F.A., M. Caws, A Gibson, and D. Young. *Modern laboratory diagnosis of tuberculosis*, *Lancet Infect. Dis.* 2003, 3: 141-147
4. Drobniewski FA, Hoffner S, Rusch-Gerdes S, Skenders G, Thomsen V; WHO European Laboratory Strengthening Task Force. *Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe*. *Eur Respir J.* 2006 Nov; 28(5):903-9.

URM-C02

SD BIOLINE TB Ag MPT64®

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Hasta la fecha se han identificado más de 33 proteínas diferentes que *Mycobacterium tuberculosis* libera al medio de cultivo durante su fase replicativa. Una de esas proteínas, Ag MPT64, fue encontrada solamente en el fluido de cultivo de las cepas del complejo *M. tuberculosis*. La prueba rápida SD BIOLINE TB Ag MPT64, es una prueba de identificación inmunocromatográfica para el complejo *M. tuberculosis* que usa anti-MPT64 monoclonal de ratón. Esta prueba debe ser usada en combinación con sistemas de cultivo de micobacterias sólidos y/o líquidos para lograr una identificación rápida del complejo *Mycobacterium tuberculosis* o, por exclusión, de la presencia de micobacterias atípicas.

Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-MPT64 se encuentran inmovilizados sobre una membrana de nitrocelulosa como material de captura (línea de prueba). Otros anticuerpos reconocen otros epítomos del MPT64, conjugados con las partículas del coloide para la captura del antígeno y la detección en un ensayo tipo sándwich. Cuando la muestra es aplicada en el pocillo de muestras, esta fluye lateralmente a través de la membrana, el anticuerpo-conjugado coloide dorado, se une al antígeno MPT64 en la muestra, en medio líquido. El complejo entonces continúa fluyendo y se une al anti-MPT64 monoclonal de ratón sobre la fase sólida en la línea de prueba, produciendo una banda de color de rojo a púrpura. En ausencia del MPT64 no hay línea en la región de banda de prueba.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Bacilos ácido-alcohol resistentes aislados en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Se identifica: *Mycobacterium tuberculosis* complex

TIEMPOS DE RESPUESTA

Desde 1-2 días laborables desde la positividad de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fabre M., Vong R., Gaillard T., Merens A., Gérôme P., Saint-Blancard P., Mechai F., Janvier F., Nouridjan F., Soler C. *Evaluation of the SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid for the diagnosis of tuberculosis*. Pathol. Biol. 2011, 59: 26-28
2. Kumar V.G.S., Urs T.A., Ranganath R.R. *MPT64 Antigen detection for rapid confirmation of M. tuberculosis isolates*. BMC Research Notes 2011, 4:79-81

URM-C03

INNOLiPA MYCOBACTERIA V2®

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Este tipo de ensayo ha sido diseñado para la detección e identificación del género *Mycobacterium* y 16 especies micobacterianas diferentes (*M. tuberculosis* complex, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. genavense*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. celatum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*/*M. peregrinum*, *M. smegmatis*) a partir de cultivos líquidos y sólidos. Utiliza sondas de ADN y se basa en las diferencias en los nucleótidos de la región espaciadora del ARN ribosómico (ARNr) 16S-23S. Se basa en el principio de la hibridación reversa. El material de ADN biotinilado se hibrida con sondas de oligonucleótidos específicos, inmovilizadas como sondas paralelas sobre tiras basadas en membranas. La tira lleva fijadas 22 sondas de ADN paralelas y 2 sondas de control. Tras la hibridación, se añade estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina, que queda ligada a cualquier híbrido biotinilado que se haya formado con anterioridad. La incubación con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y el cromógeno nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT) produce un precipitado de color púrpura/marrón.

Previamente al ensayo se debe realizar una reacción de amplificación de la región espaciadora del ARN ribosómico 16S-23S utilizando secuencias de oligonucleótidos cebadores (*primers*) biotinilados, esta reacción permite obtener el material amplificado biotinilado que se utilizará en la fase de hibridación anteriormente comentada

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Bacilos ácido-alcohol resistentes aislados en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Se identifica: *Mycobacterium* _____ (género y especie)

TIEMPOS DE RESPUESTA

Desde 1 día hasta 3 semanas desde la positividad de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tortoli E., Mariottini A., and Mazzareli G. *Improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for rapid Mycobacteria identification*. J. Clin. Microbiol. 2003, 41:4418-4420
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005
3. Drobniowski FA, Hoffner S, Rusch-Gerdes S, Skenders G, Thomsen V; WHO European Laboratory Strengthening Task Force. *Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe*. Eur Respir J. 2006 Nov; 28(5):903-9.

URM-C04

Genotype® CM/AS

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Este tipo de ensayo ha sido diseñado para la detección e identificación del género *Mycobacterium* y 30 especies micobacterianas diferentes a partir de cultivos líquidos y sólidos, utiliza sondas de ADN y se basa en las diferencias en los nucleótidos de la región espaciadora del ARN ribosómico (ARNr) 16S-23S. Se basa en el principio de la hibridación reversa. El material de ADN biotinilado se hibrida con sondas de oligonucleótidos específicos, inmovilizadas como sondas paralelas sobre tiras basadas en membranas (basado en la tecnología DNA-STRIP®).

GenoType Mycobacterium CM (*Common Mycobacteria*), permite la identificación de las siguientes especies de micobacterias: *M. avium* ssp., *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. tuberculosis* complex, y *M. xenopi*.

El kit **GenoType Mycobacterium AS** (*Additional Species*) permite ampliar la identificación incluyendo las siguientes especies de micobacterias: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*/*M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum*, y *M. shimoidei*.

El procedimiento completo se divide en tres pasos: aislamiento de DNA procedente de cultivo, una amplificación múltiplex con *primers* marcados con biotina, y una hibridación reversa.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Bacilos ácido-alcohol resistentes aislados en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Se identifica: *Mycobacterium* _____ (género y especie)

TIEMPOS DE RESPUESTA

Desde 1 día hasta 3 semanas desde la positividad de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Russo C., Tortoli E., Menichella D. *Evaluation of the new GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species*. J. Clin. Microbiol. 2006, 44: 334-339
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005
3. Drobniewski FA, Hoffner S, Rusch-Gerdes S, Skenders G, Thomsen V; WHO European Laboratory Strengthening Task Force. *Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe*. Eur Respir J. 2006 Nov; 28(5):903-9.

URM-C05

PRA (PCR-RFLP *hsp65*kDa)

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Esta técnica se basa en la amplificación (PCR) del gen *hsp65* y posterior restricción enzimática con las enzimas *BstEII* y *HaeIII*, seguida del análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) obtenidos. Esta técnica

permite la identificación de la mayoría de especies aisladas en los laboratorios clínicos de manera rápida, precisa y económica. Existen bases de datos *on-line* (<http://app.chuv.ch/prasite/index.htm>) donde pueden consultarse los polimorfismos propios de las diferentes especies.

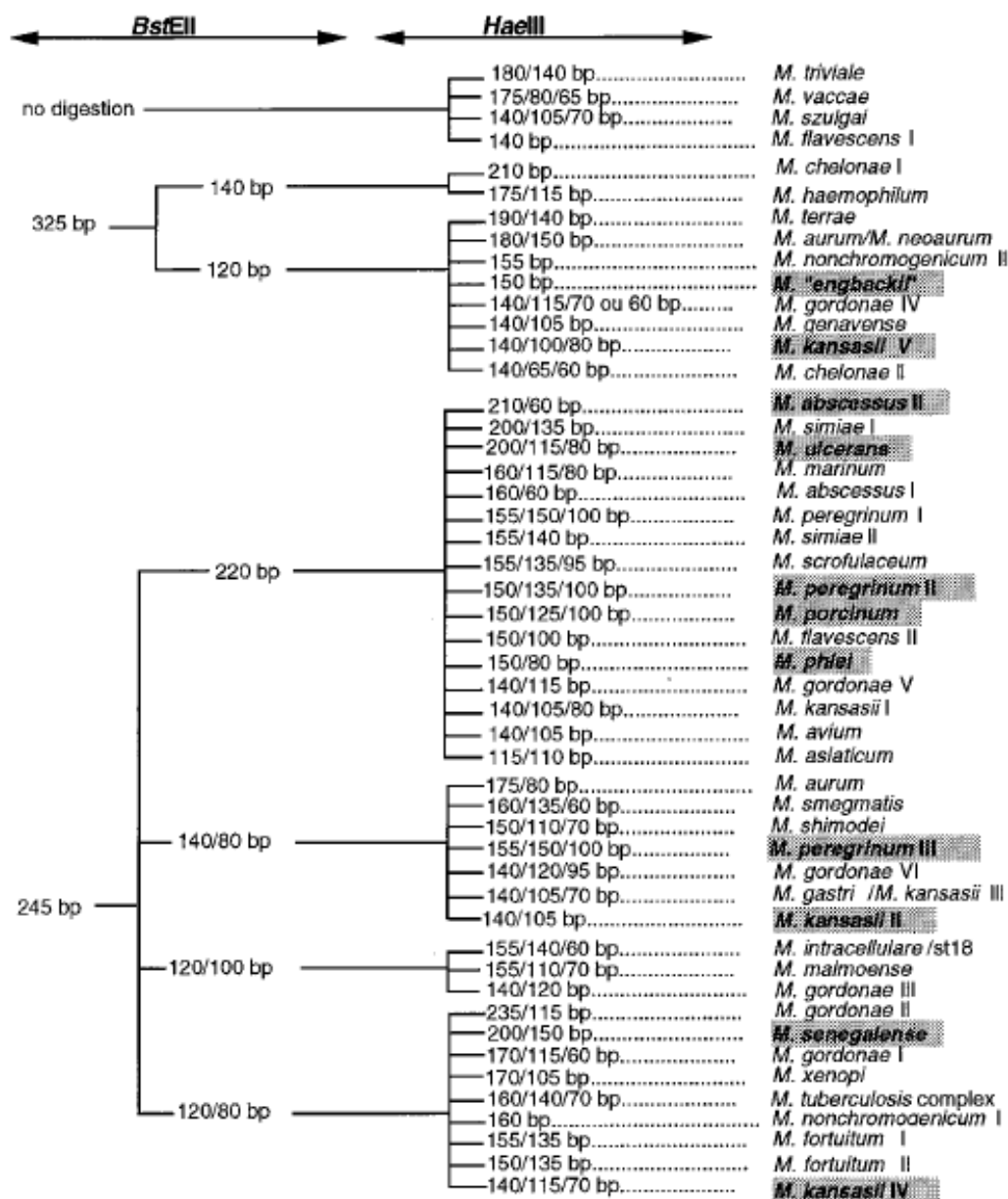
REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Bacilos ácido-alcohol resistentes aislados en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Se identifica: *Mycobacterium* _____ (género y especie)



TIEMPOS DE RESPUESTA

Desde 2- 3 semanas desde la positividad de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Telenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Böttger EC., Bodmer T. *Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis*. J. Clin. Microbiol. 1993, 31:175-178
2. Devallois A., GOH K.S., Rastogi N. *Rapid identification of Mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species*. J. Clin. Microbiol. 1997, 31:2969-2973

3. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias* 9a. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-C06

16S-23S rDNA

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Esta técnica se basa en la amplificación (PCR) del espaciador del gen 16S-23S rDNA y posterior restricción enzimática con las enzimas *HaeIII*, *DdeI*, *TaqI*, *CfoI*, *HinfI*, *Avall*, *MspI*, seguida del análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) obtenidos. Permite la identificación de la mayoría de especies aisladas en los laboratorios clínicos de manera rápida, precisa y económica. Existen bases de datos donde pueden consultarse los polimorfismos propios de las diferentes especies.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Bacilos ácido-alcohol resistentes aislados en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Se identifica: *Mycobacterium* _____ (género y especie)

PCR product	HaeIII fragments [lane no. in Fig. 4]	CfoI	TaqI	Species and RFLP genotype	No. of strains
257	No restriction	No restriction	226, 31	<i>M. abscessus</i>	(9)
			No restriction	<i>M. chelonae</i> I	(3)
			136, 121	<i>M. chelonae</i> II	(10)
			121, 104, 31	<i>M. chelonae</i> III	(1)
279, 257	170, 148, 109	[3]	257, 200, 79	<i>M. fortuitum</i> I	(2)
280	172, 108	[5]	No restriction	<i>M. fortuitum</i> II	(4)
			280, 200, 80	<i>M. fortuitum</i> III	(1)
298, 257	148, 109, 80	[2]	257, 185, 133	<i>M. fortuitum</i> IV	(1)
257	148, 109	[1]	No restriction	<i>M. fortuitum</i> V	(8)
			174, 72	<i>M. senegalense</i>	(10)
298, 280	170, 110, 78	[4]	199, 185, 133, 81	<i>M. fortuitum</i> VI	(2)
300, 281	191, 172, 109	[6]	205, 167, 133, 76	<i>M. fortuitum</i> VII	(1)
			281, 167, 133	<i>M. fortuitum</i> VIII	(2)
282	110, 86, 49, 33	[7]	No restriction	<i>M. fortuitum</i> IX	(1)
296	108, 80	[8]	155, 141	<i>M. fortuitum</i> X	(6)
305, 270	173, 115, 97	[9]	305, 189, 81	<i>M. peregrinum</i> I	(11)
275	175, 100	[10]	191, 84	<i>M. peregrinum</i> II	(5)
288	173, 115	[11]	204, 84	<i>M. peregrinum</i> III	(1)
276	160, 86		194, 71	<i>M. smegmatis</i>	(2)
306	103, 85		No restriction	<i>M. flavescens</i> I	(1)
300	203, 97		No restriction	<i>M. flavescens</i> II	(4)
	192, 109, 97, 91		297, 210, 70	<i>M. flavescens</i> III	(2)
285	187, 91		181, 107	<i>M. hassiacum</i>	(1)
290	130, 110, 50		No restriction	<i>M. sp. (M511, M516)</i>	(2)
295	No restriction		214, 70	<i>M. duvalii</i>	(1)
297	208, 89		195, 102	<i>M. chlorophenolicum</i>	(1)
300	190, 110		168, 132	(Avali) <i>M. porcinum</i>	(1)
				<i>M. farcinogenes</i>	(20)
305	125, 90, 60, 30		No restriction	<i>M. obuense</i>	(1)
	189, 107		221, 63	<i>M. phlei</i> I	(4)
			221, 85	<i>M. phlei</i> II	(1)
315	121, 115, 47, 35		No restriction	<i>M. rhodesiae</i>	(1)
308	179, 50, 46, 33		No restriction	<i>M. vaccae</i>	(4)
310	115, 50, 30		No restriction	<i>M. parafortuitum</i> I	(1)
	115, 90, 45, 30		No restriction	<i>M. parafortuitum</i> II	(3)
320	230, 90		No restriction	<i>M. hodleri</i>	(1)
330	205, 130, 125, 60		240, 230, 100	<i>M. mucogenicum</i>	(1)
330, 310	110, 105, 90, 50, 45		310, 210, 130	<i>M. neoaurum</i>	(1)
330, 320	125, 110, 105, 80		No restriction	<i>M. aurum</i>	(2)

PCR product	HaeIII [lane no. in Fig. 3]	CfoI	DdeI	TaqI	Species and RFLP genotype	No. of strains
205	130, 70	[10] — 0			<i>M. xenopi</i>	(59)
212	95, 75, 42	— B			<i>M. kansasii</i> III	(0)
	168, 51	[17] — 144, 75			<i>M. asiaticum</i>	(3)
	113, 57, 51	[8] — 0			<i>M. tuberculosis</i>	(90)
	137, 52, 33	[11] — A			<i>M. interjectum</i>	(1)
	138, 85	[12] — 0			<i>M. intermedium</i>	(4)
	95, 85, 42	[6] — A	 A (AvaI)		<i>M. kansasii</i> IV	(9)
	92, 85, 42	[7] — A	 A (AvaI)		<i>M. avium</i>	(111)
		0	 C		<i>M. bohemicum</i>	(2)
		0	 A		<i>M. intracellulare</i> I	(19)
		0	 C		<i>M. scrofulaceum</i> Ia	(10)
217-220	127, 93	[9] — 0	 A		<i>M. intracellulare</i> IIa	(14)
		A	 C		<i>M. scrofulaceum</i> Ib	(1)
					<i>M. sp. (scrofulaceum)</i>	(5)
	92, 75, 52	[5] — 0			<i>M. intracellulare</i> IIb	(1)
	85, 74, 42	[3] — C			<i>M. mageritense</i>	(11)
		0			<i>M. sp. (mageritense)</i>	(2)
	85, 71, 64	[2] — A	 A		<i>M. kansasii</i> IIa	(5)
			 B		<i>M. szulgai</i>	(8)
	80, 79, 63	[1] — D			<i>M. sp. (xenopi)</i>	(2)
	149, 71	[14] — A			<i>M. kansasii</i> IIb	(10)
			 0 (MspI)		<i>M. simiae</i>	(15)
			 A		<i>M. genavense</i>	(11)
225	85, 80, 42	[4] — 0	 A		<i>M. lentilflavum</i>	(5)
			 A		<i>M. triplex</i>	(2)
231	146, 85	[13] — A			<i>M. gastri</i>	(5)
237	152, 85	[16] — A			<i>M. kansasii</i> VI	(4)
230	151, 79	[15] — B			<i>M. shimoidae</i>	(3)
211	No restriction	[18] — 0			<i>M. goodii</i>	(48)
220	No restriction	[19] — 0	 A		<i>M. kansasii</i> I	(23)
			 0		<i>M. marinum/ulcerans</i>	(16/3)
		A	 A (HinfI)		<i>M. kansasii</i> V/M. <i>leprae</i>	(1/0)
224	No restriction	[20] — A	 E		<i>M. celatum</i>	(15)
231	No restriction	[21] — B	 D		<i>M. sp. (gastri)</i>	(10)
234-237	No restriction	[22] — 0	 D		<i>M. conspicuum</i>	(1)
			 A		<i>M. haemophilum</i>	(3)
305	No restriction	212, 86			<i>M. triviale</i> I	(1)
		180, 80, 40			<i>M. triviale</i> II	(1)
310	175, 90, 48	[25] — 236, 40, 30	 180, 127		<i>M. nonchromogenicum</i> I	(3)
		236, 70	 180, 127		<i>M. nonchromogenicum</i> II	(1)
318	97, 80, 44	[23] — 0	 0		<i>M. ferreus</i> I	(1)
314	170, 94, 50	[24] — 244, 70	 254, 60		<i>M. ferreus</i> II	(2)
			 0		<i>M. ferreus</i> III	(5)
		190, 60, 55	 0		<i>M. ferreus</i> IV	(1)

FIG. 1. Algorithm of RFLP patterns of 28 slowly growing mycobacterial species and 4 *Mycobacterium* spp. of uncertain taxonomic status from PCR-amplified 16S-23S rDNA spacer sequences (547 strains). PCR products and restriction fragments are designated by molecular sizes in base pairs. *Hae*III species-specific patterns are highlighted by boxes. *Cfo*I patterns A to D are as follows: A, 126 to 144 and 91 to 96 (digest size varies depending on the PCR product size); B, 129 to 146 and 83; C, 126, 63, and 30; D, 160 and 62. *Dde*I patterns A-E are as follows: A, 120 and 90; B, 120 and 80; C, 120 and 70; D, 120 and 100; E, 214. *Taq*I pattern A is 155 and 70; 0, no restriction. Type strains were assigned to genotype I if more than one pattern occurred in a species. Genotypes Ia and Ib or IIa and IIb indicate that the strains are genetically very similar but new RFLP genotypes have occurred after loss or acquisition of one *Hae*III restriction site due to allelic microheterogeneity. *M. leprae* and *M. kansasii* III RFLP patterns were deduced from nucleotide sequence accession no. X56657 (EMBL) and the *M. kansasii* genotype III sequence published by Alcáide et al. (1). For details concerning *Ava*II, *Hae*II, and *Msp*I patterns and descriptions of *Mycobacterium* spp., see the text.

TIEMPOS DE RESPUESTA

Desde 2 a 3 semanas desde la positividad de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roth A., Reischl U., Streubel A., Naumann L., Kroppenstedt R.M., Habicht M, Fischer M., and Mauch H. *Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases*. J. Clin. Microbiol. 2000, 38:1094-1104
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

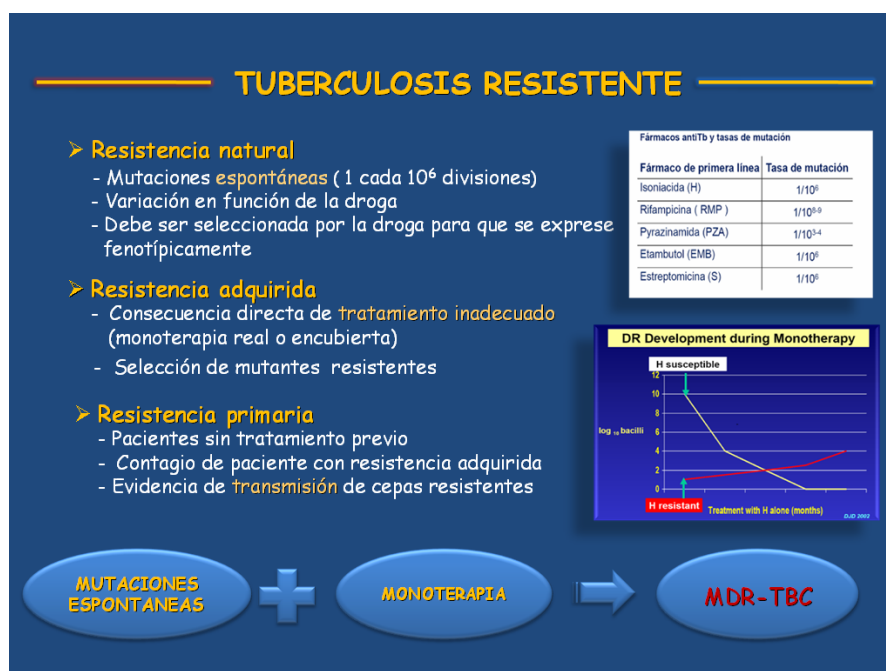
URM-D00

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD *M. tuberculosis* complex

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Determinar la sensibilidad a diferentes antimicrobianos de elección en el tratamiento de la tuberculosis.

En una población micobacteriana existe estadísticamente un determinado porcentaje de individuos que portan resistencia a las diferentes drogas, en particular a isoniacida y a rifampicina. El método de las proporciones desarrollado por Canetti se basa en que define como resistente aquella población de micobacterias en la cual existe un número de unidades formadoras de colonias (UFC) resistentes al fármaco superior al 1% de la población total.



REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

M. tuberculosis complex aislado en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

BIBLIOGRAFÍA

1. NCCLS (actualmente Clinical and Laboratory Standards Institute) *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes*. Approved Standard M24-A, 2003
2. Siddiqi S.H., *Modified proportion agar dilution test for slowly growing mycobacteria*. Clinical Microbiology Procedures Handbook, vol.I, American Society for Microbiology 1992, p.5.13.1-5.13.15
3. Butler W.R., and Kilburn J.O. *Improved method for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide* J. Clin. Microbiol. 1982, 16:1106-1109
4. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-D01

MÉTODOS FENOTÍPICOS

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Los métodos fenotípicos se basan en la realización del estudio de sensibilidad frente a los fármacos utilizados en el tratamiento. En la década de 1960, la OMS encargó a un grupo de expertos definir la metodología para la realización de dichos estudios. Se propuso la utilización de medios de cultivo sólidos con concentraciones fijas de antibióticos capaces de diferenciar sensibilidad de resistencia y se aceptaron tres métodos distintos de interpretación: a) la **ratio de resistencia**, descrito por Mitchison, que compara la CIM (concentración inhibitoria mínima) de una determinada cepa con la de una cepa de referencia; b) las **concentraciones absolutas**, descrito por Meisser, que compara el número de colonias en presencia del fármaco con el número de colonias en medio de cultivo sin el fármaco; y c) las **proporciones críticas**, descrito por Canetti y Grosset, en que se comparan las colonias crecidas en diferentes diluciones con las presentes en medio sin antibiótico, interpretando el resultado a través de la proporción de colonias capaces de crecer en presencia del fármaco. Éste último es el más utilizado y la mayoría de métodos actuales se derivan de él. Inicialmente la técnica se diseñó para su utilización en medio de Löwenstein-Jensen y para los fármacos de primera línea, exceptuando la pirazinamida. Poco después se estandarizó para los medios 7H10 y 7H11 de Middlebrook. En ambos casos se incluyen dos diluciones distintas del inóculo y dos concentraciones de cada antibiótico. Las concentraciones de antibióticos utilizadas varían en algunos casos dependiendo del medio de cultivo.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

M. tuberculosis complex aislado en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

BIBLIOGRAFÍA

1. NCCLS (actualmente Clinical and Laboratory Standards Institute) *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes*. Approved Standard M24-A, 2003
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-D01.1

Método de las Proporciones fármacos 1ª y 2ª línea

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Método descrito por Canetti y Grosset en el que se comparan las colonias crecidas en diferentes diluciones con las presentes en medio sin antibiótico, interpretando el resultado a través de la proporción de colonias capaces de crecer en presencia del fármaco (<1% ó >1%). Inicialmente la técnica se diseñó para su utilización en medio de Löwenstein-Jensen y para los fármacos de primera línea, exceptuando la pirazinamida. Poco después se estandarizó para los medios Middlebrook 7H10 y 7H11.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

M. tuberculosis complex aislado en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

M. tuberculosis complex: SENSIBLE o RESISTENTE a fármacos de primera línea (isoniacida, rifampicina, pirazinamida, etambutol, estreptomycin) y/o segunda línea (etionamida, PAS, capreomicina, rifabutin, kanamicina, cicloserina, clofazimina, tiacetazona).

TIEMPOS DE RESPUESTA

De 4 a 6 semanas desde el aislamiento e identificación de la micobacteria en los cultivos

BIBLIOGRAFÍA

1. NCCLS (actualmente Clinical and Laboratory Standards Institute) *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes*. Approved Standard M24-A, 2003
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-D01.2

Método Etest[®]

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Es una técnica cuantitativa para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los antimicrobianos. Consiste en una tira de plástico calibrada con una escala de concentraciones en µg/ml y un código para identificar el antimicrobiano en la cara anterior de la tira, y un gradiente predefinido de concentraciones de antibiótico con 15 diluciones dobles seriadas en la cara posterior de la tira. Cuando se aplica una tira de Etest en una superficie de agar inoculado, el gradiente exponencial preformado de antimicrobiano se transfiere inmediatamente a la matriz de agar. Después de la correspondiente incubación, se forma una elipse simétrica de inhibición centrada a lo largo de la tira. La CMI se lee directamente en la escala en el punto de intersección de la elipse de inhibición con la tira.

El Etest se realiza a demanda según van produciéndose los resultados positivos en los medios de cultivo líquidos.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

M. tuberculosis complex aislado en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

M. tuberculosis complex: SENSIBLE o RESISTENTE a fármacos de primera línea (isoniacida, rifampicina, etambutol, estreptomycin) y/o segunda línea (etionamida, amikacina, ciprofloxacino, linezolid, doxiciclina, amoxicilina-ácido-clavulánico, cotrimoxazol, imipenem, moxifloxacino).

TIEMPOS DE RESPUESTA

10-14 días desde el aislamiento e identificación de la micobacteria en los cultivos

BIBLIOGRAFÍA

1. Wanger A, K Mills. *Testing of Mycobacterium tuberculosis susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, Rifampin, and Streptomycin by using Etest*. J. Clin. Microbiol. 1996, 34:1672-1676
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-D01.3

Pirazinamida, método de las Proporciones pH 5,5

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Método en el que se comparan las colonias crecidas en dos diluciones (25µg/ml y 50 µg/ml) con las presentes en medio sin antibiótico, interpretando el resultado a través de la proporción de colonias capaces de crecer en presencia del fármaco (<10% ó >10%). El medio empleado es Middlebrook 7H10 suplementado con ADC (albúmina, dextrosa, catalasa) a pH 5,5.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

M. tuberculosis complex aislado en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

M. tuberculosis complex: SENSIBLE a pirazinamida

M. tuberculosis complex: RESISTENTE a pirazinamida

TIEMPOS DE RESPUESTA

De 4 a 6 semanas desde el aislamiento e identificación de la micobacteria en los cultivos

BIBLIOGRAFÍA

1. Butler W.R., and Kilburn J.O. *Improved method for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide*. J. Clin. Microbiol. 1982, 16:1106-1109
2. NCCLS (actualmente Clinical and Laboratory Standards Institute) *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes*. Approved Standard M24-A, 2003
3. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E.,

Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-D02

MÉTODOS GENOTÍPICOS

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Los métodos genotípicos se basan en la detección de mutaciones en regiones del genoma que se asocian a resistencia a diferentes fármacos.

Telenti A. *Thorax* 1998; 53:793-97

Table 1 Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*

Antimicrobial agent	Mechanism of action	Genes involved in resistance	Frequency of mutations associated with resistance	Mechanism of resistance
Isoniazid	Inhibition of mycolic acid biosynthesis	(i) <i>katG</i> (catalase-peroxidase) (ii) <i>inhA</i> (enoyl-acyl carrier protein reductase) (iii) <i>ahpC</i> (alkyl hydroperoxide reductase)	(i) 42-58% (ii) 21-34% (iii) 10-15%	(i) Mutations in <i>katG</i> result in failure to generate an active intermediate of isoniazid (ii) Over expression of <i>inhA</i> allows continuation of mycolic acid synthesis (iii) <i>ahpC</i> mutations may just serve as a marker for lesions in <i>katG</i>
Rifampicin	Inhibition of transcription	<i>rpoB</i> (β subunit of RNA polymerase)	96-98%	Mutations in <i>rpoB</i> prevent interaction with rifampicin
Streptomycin	Inhibition of protein synthesis	(i) <i>rpsL</i> (ribosomal protein S12) (ii) <i>rrs</i> (16S rRNA)	(i) 52-59% (ii) 8-21%	Mutations prevent interaction with streptomycin. Resistance not associated with mutation in <i>rpsL</i> or <i>rrs</i> is usually low level
Ethambutol	Inhibition of arabinogalactan and liparabinomannan biosynthesis	<i>embCAB</i> (arabinosyl transferase)	47-65%	Over expression or mutation of <i>EmbB</i> allow continuation of arabinan biosynthesis. Resistance not associated with <i>EmbB</i> mutation is usually low level
Pyrazinamide	Unknown	<i>pncA</i> (pyrazinamidase-nicotinamidase)	72-97%	Loss of pyrazinamidase activity results in decreased conversion of pyrazinamide to pyrazinoic acid, the putative active moiety
Fluoroquinolones	Inhibition of the DNA gyrase	<i>gyrA</i> (DNA gyrase subunit A)	75-94%	Mutations in <i>gyrA</i> prevent interaction with fluoroquinolones. Mutations in <i>gyrB</i> and efflux may contribute to resistance

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

M. tuberculosis complex aislado en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Telenti A, *Genetics of drug resistant tuberculosis*. *Thorax* 1998, 53: 793-798

2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias* 9a. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-D02.1

INNOLiPA RIF-TB[®]

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Este tipo de ensayo ha sido diseñado para la detección e identificación *Mycobacterium tuberculosis* complex y su resistencia a la rifampicina una vez realizada la amplificación a partir de los medios de cultivo. Se basa en el principio de la hibridación reversa. El material de ADN biotinilado se hibrida con sondas de oligonucleótidos específicos, inmovilizadas sobre tiras como líneas paralelas basadas en membranas. Tras la hibridación, se añade estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina, que queda ligada a cualquier híbrido biotinilado que se haya formado con anterioridad. La incubación con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y el cromógeno nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT) produce un precipitado de color púrpura/marrón.

Previamente al ensayo se debe realizar una reacción de amplificación de la región del gen que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa (*rpoB*) que confiere resistencia a la rifampicina. Los productos de la amplificación son subsecuentemente hibridados utilizando una tira que incluye 10 sondas y un control. La presencia de *Mycobacterium tuberculosis* complex está monitorizada mediante la presencia de una sonda específica. La reactividad de un fragmento amplificado con las sondas del tipo “salvaje” S1, S2, S3, S4 y S5 permite la detección fácil de las mutaciones que confieren la resistencia a la rifampicina. Estas sondas “S” cubren la totalidad de la región implicada. Si una mutación está presente en una de las cinco regiones, la sonda correspondiente no podrá hibridar debido a las condiciones de astringencia usadas para la hibridación y para los lavados. Adicionalmente, se diseñaron cuatro sondas para hibridar con secuencias mutantes de las cuatro mutaciones observadas más habitualmente: R2 (D516V), R4a (H526Y), R4b (H526D) y R5 (S531L).

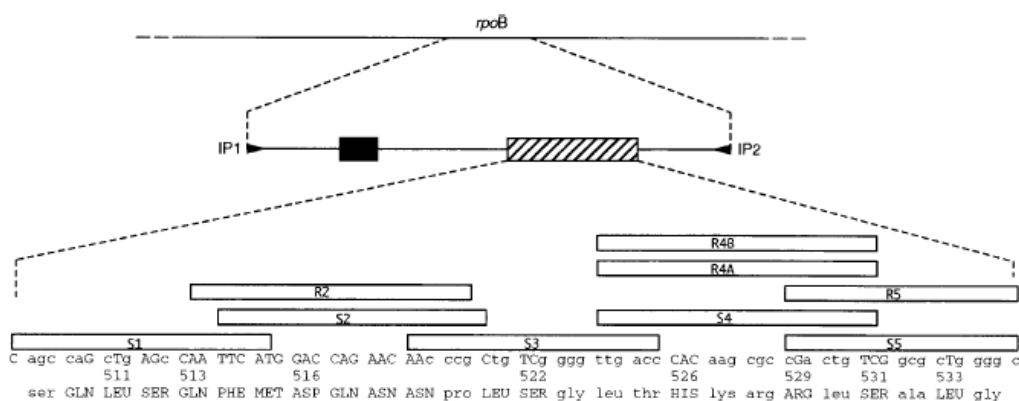


FIG. 1. Schematic representation of the *rpoB* gene and positions of primers and probes. The arrowheads indicate the positions of primers IP1 and IP2. The black box indicates the position of the *M. tuberculosis* complex probe. The hatched box corresponds to the area scanned by the S and R probes on the LiPA strips (indicated by horizontal bars). The wild-type nucleotide and amino acid sequences in the relevant part of the *rpoB* gene are presented as described by Telenti et al. (23). The nucleotide and amino acid positions indicated in capital letters have been found to be involved in RMP.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

M. tuberculosis complex aislado en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Se detecta mutación en el gen *rpoB*

No se detecta mutación en el gen *rpoB*

TIEMPOS DE RESPUESTA

De 1-5 días laborables desde el aislamiento e identificación de la micobacteria en los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rossau R., Traore H., De Beenhouwer H., Mijs W., Jannes G., De Rijk P., and Portaels F. *Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB Assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis Complex and its resistance to rifampin*. Antimicrob. Agents Chemoter. 1997, 41:2093-2098
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-D02.2

Genotype MDRplus[®]

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

El kit Genotype MTBDRplus está basado en la tecnología DNA.STRIP[®] y permite la identificación mediante genética molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a rifampicina y/o isonizida, desde cultivo o material de paciente procedente de muestras pulmonares con baciloscopia positiva. La identificación de la resistencia a rifampicina es posible gracias a la detección de las mutaciones más significativas del gen *rpoB* (que codifica por la subunidad β de la ARN polimerasa). Para investigar la resistencia de isoniácida de alto nivel se amplifica el gen *katG* (que codifica la catalasa peroxidasa), y para la resistencia a isoniácida de bajo nivel, es examinada la región del promotor del gen *inhA* (que codifica la NADH enoil ACP reductasa).

El procedimiento completo se divide en tres pasos: aislamiento de DNA procedente de cultivo (placas de cultivo/medio líquido) o de material directo (muestras pulmonares baciloscopia positiva decontaminadas), una amplificación múltiple con primers marcados con biotina, y una hibridación reversa.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

M. tuberculosis complex aislado en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Se detecta mutación en el gen *rpoB* y/o *katG* y/o *inhA*

No se detecta mutación en el gen *rpoB* y/o *katG* y/o *inhA*

Table 1: Mutations in the *rpoB* gene and the corresponding wild type and mutation bands [according to [7]]

failing wild type band[s]	codons analyzed	developing mutation band	mutation
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B	H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531Q* S531W L533P

* This rare mutation has only been detected theoretically [in silico] yet. It is therefore possible that it cannot be detected in vitro.

Table 2: Mutations in the *katG* gene and the corresponding wild type and mutation bands

failing wild type band	codon analyzed	developing mutation band	mutation
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1 <i>katG</i> MUT2	S315T1 S315T2

Table 3: Mutations in the *inhA* promoter region and the corresponding wild type and mutation bands

failing wild type band	analyzed nucleic acid position	developing mutation band	mutation
<i>inhA</i> WT1	-15 -16	<i>inhA</i> MUT1 <i>inhA</i> MUT2	C15T A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A <i>inhA</i> MUT3B	T8C T8A

TIEMPOS DE RESPUESTA

De 1-5 días laborables desde el aislamiento e identificación de la micobacteria en los cultivos

BIBLIOGRAFÍA

1. Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Lowrie D., Cole S.T., Colston M.J., Matter L., Schopfer K., Bodmer T. *Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993, 341: 647-650
2. Alonso m., Palacios J.J., Herranz M., Penedo A., Menéndez A., Bouza E., García de Viedma D. *Isolation of Mycobacterium tuberculosis strains with a silent mutation in rpoB leading to potential misassignment of resistance category*. J. Clin. Microbiol. 2011, 49:2688-2690
3. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-D02.3

Genotype MDRs/®

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

El ensayo GenoType MTBDRs/ (second line) está basado en la tecnología DNA-STRIP® y permite la identificación genética del complejo *M. tuberculosis* y su resistencia a fluoroquinolonas (ciprofloxacino, ofloxacino, moxifloxacino, etc.) y/o aminoglucósidos/péptidos cíclicos (antibióticos inyectables como kanamicina, amikacina/ capreomicina, viomicina) y/o etambutol a partir de cultivo o muestra pulmonar con baciloscopia positiva. La identificación de la resistencia a fluoroquinolonas está basada en la detección de las mutaciones más significativas de gen *gyrA* (que codifica por la subunidad A de la DNA girasa). Para la detección de las resistencias a aminoglucósidos/péptidos cíclicos se amplifica el gen 16 rRNA (*rrs*) y para la detección de la resistencia a etambutol el gen *embB* (el cual, junto al gen *embA* y el *embC*, codifican la arabinosil transferasa).

El procedimiento completo se divide en tres pasos: aislamiento de DNA procedente de cultivo (placas de cultivo/medio líquido) o de material directo (muestras pulmonares baciloscopia positiva decontaminadas), una amplificación múltiplex con *primers* marcados con biotina, y una hibridación reversa.

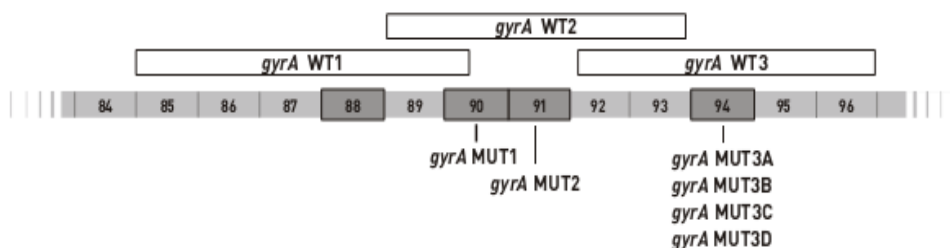


Fig. 1: Fluoroquinolone resistance region of the *gyrA* gene

gyrA WT1-3: *gyrA* wild type probes; *gyrA* MUT1-3: *gyrA* mutation probes. The numbers specify the positions of the amino acids [codons] for all mutations listed in the table. The codons for which mutation probes were designed are highlighted.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

M. tuberculosis complex aislado en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Se detecta mutación en el gen *gyrA* y/o *rrs* y/o *embB*

No se detecta mutación en el gen *gyrA* y/o *rrs* y/o *embB*

Mutaciones en el gen *gyrA* y su correspondiente wild type y sondas de mutación (de acuerdo con Cheng et al.2004, Aubry et al. 2006, Matrat et al. 2006 y Kocagöz et al 1996)

Ausencia De sonda Wild type	Codón analizado	Sonda de mutación	Mutación	Resistencia fenotípica
<i>gyrA</i> WT1	85-90	-	C88S	FLQ
			A88Y	
<i>gyrA</i> WT2	89-93	<i>gyrA</i> MUT1	A90V	
		<i>gyrA</i> MUT2	S91P	
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT 3A	D94A	
		<i>gyrA</i> MUT 3B	D94N	
			D94Y	
		<i>gyrA</i> MUT 3C	D94G	
		<i>gyrA</i> MUT 3D	D94 ¹⁾	

FLQ= fluoroquinolona (p.ej.: ofloxacino y moxifloxacino)

¹⁾ Esta mutación rara ha sido detectada sólo teóricamente (in silico) hasta ahora. Es por tanto posible que la mutación no pueda ser detectada *in vitro*.

Mutaciones en el gen *rrs* y sus correspondientes sondas wild type y de mutación (de acuerdo con Maus et al. (Feb) 2005 y Maus et al. (Aug) 2005)

Ausencia De sonda Wild type	Ácido nucleico analizado posición	Sonda De mutación	Mutación	Resistencia fenotípica			
<i>rrs</i> WT1	1401	<i>rrs</i> MUT1	A1401G	CAP		AMK	KAN
	1402	-	C1402T	CAP	VIO		KAN
<i>rrs</i> WT2	1484	<i>rrs</i> MUT2	G1484T	CAP	VIO	AMK	KAN

CAP= capreomicina, VIO= viomicina, KAN= kanamicina, AMK= amikacina

Mutaciones en el gen *embB* y sus correspondientes sondas wild type y de mutación (de acuerdo con Jonson et al. 2006 y Plinke et al. 2006)

Ausencia De sonda Wild type	Codón analizado	Sonda De mutación	Mutación	Resistencia fenotípica
<i>embB</i> WT	306	<i>EmbB</i> MUT1A	M306I ²⁾	EMB
		<i>EmbB</i> MUT1B	M306V	
		-	M306I ³⁾	

EMB= etambutol

²⁾ cambio de base en el codón 306: ATG → ATA

³⁾ cambio de base en el codón 306: ATG → ATC/ATT

TIEMPOS DE RESPUESTA

De 1-5 días laborables desde el aislamiento e identificación de la micobacteria en los cultivos

BIBLIOGRAFÍA

1. Telenti A. *Genetics of drug resistant tuberculosis*. Thorax 1998, 53: 793-798
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-E00

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD *M. avium* complex

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Los macrólidos (claritromicina y azitromicina) constituyen el único grupo de antimicrobianos en los que se ha demostrado una correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* y la respuesta clínica de los pacientes con enfermedad por *Mycobacterium avium* complex. Sin embargo, el hecho de que haya cepas resistentes a macrólidos, así como en el caso de pacientes que no toleran este tipo de terapia, justifica la realización de pruebas de sensibilidad a otros fármacos (especialmente linezolid y moxifloxacino), aunque la correlación clínica de los resultados no haya sido todavía demostrada.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Mycobacterium avium complex aislado en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

BIBLIOGRAFÍA

1. NCCLS (actualmente Clinical and Laboratory Standards Institute) *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes. Approved Standard M24-A*, 2003
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias* 9a. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-E01

MICRODILUCIÓN CLARITROMICINA-*M. avium* complex

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Los macrólidos (claritromicina y azitromicina) constituyen el único grupo de antimicrobianos en los que se ha demostrado una correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* y la respuesta clínica de los pacientes con enfermedad por *Mycobacterium avium* complex. La microdilución a claritromicina se considera el método de referencia.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Mycobacterium avium complex aislado en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Claritromicina: SENSIBLE (CIM ≤ 16 $\mu\text{g/ml}$)

Claritromicina: RESISTENTE (CIM > 64 $\mu\text{g/ml}$)

TIEMPOS DE RESPUESTA

De 4 a 6 semanas desde el aislamiento e identificación de la micobacteria en los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. NCCLS (actualmente Clinical and Laboratory Standards Institute) *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes. Approved Standard M24-A*, 2003
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-E02

Etest[®] fármacos 1ª y 2ª línea-*M. avium* complex

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Es una técnica cuantitativa para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los antimicrobianos. Consiste en una tira de plástico calibrada con una escala de concentraciones en $\mu\text{g/ml}$ y un código para identificar el antimicrobiano en la cara anterior de la tira, y un gradiente predefinido de concentraciones de antibiótico con 15 diluciones dobles seriadas en la cara posterior de la tira. Cuando se aplica una tira de Etest en una superficie de agar inoculado, el gradiente exponencial preformado de antimicrobiano se transfiere inmediatamente a la matriz de agar. Después de la correspondiente incubación, se forma una elipse simétrica de inhibición centrada a lo largo de la tira. La CMI se lee directamente en la escala en el punto de intersección de la elipse de inhibición con la tira.

El Etest se realiza a demanda según van produciéndose los resultados positivos en los medios de cultivo líquidos.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Mycobacterium avium complex aislado en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

SENSIBLE o RESISTENTE a claritromicina, isoniacida, rifampicina, etambutol, estreptomina, etionamida, ciprofloxacino, linezolid, doxiciclina, cotrimoxazol, amoxicilina-ácido clavulánico, moxifloxacino.

TIEMPOS DE RESPUESTA

10-14 días desde el aislamiento e identificación de la micobacteria en los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wanger A, K Mills. *Testing of Mycobacterium tuberculosis susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, Rifampin, and Streptomycin by using Etest*. J. Clin. Microbiol. 1996, 34:1672-1676
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-F00

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD *M. kansasii*

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

El método de las proporciones en agar es uno de los métodos aceptados para la realización de pruebas de sensibilidad de *M. kansasii* a fármacos de primera línea (rifampicina, isoniacida y etambutol), se ha demostrado una buena correlación entre los métodos de dilución en agar y los de dilución en caldo. Sin embargo, el punto de corte para la isoniacida debe ser modificado ya que el rango de CIMs en las cepas salvajes de *M. kansasii* oscila entre 0,5 a 5 µg/ml.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Mycobacterium kansasii aislado en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

BIBLIOGRAFÍA

1. NCCLS (actualmente Clinical and Laboratory Standards Institute) *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes. Approved Standard M24-A*, 2003
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-F01

Rifampicina, método de las Proporciones-*M. kansasii*

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Existe una buena estandarización y correlación entre el método de las proporciones en agar (Middlebrook 7H10), microdilución en caldo (Mueller-Hinton o Middlebrook 7H9), y el sistema radiométrico (Bactec). La concentración crítica para la rifampicina es 1 µg/ml, y cuando se demuestre resistencia a la misma se debería ampliar el estudio a otros fármacos, entre ellos por su repercusión en la clínica deben analizarse: rifabutina, isoniacida, etambutol, estreptomycin, claritromicina, amikacina, ciprofloxacino y cotrimoxazol.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Mycobacterium kansasii aislado en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

SENSIBLE o RESISTENTE a rifampicina.

TIEMPOS DE RESPUESTA

De 10 días a 6 semanas desde el aislamiento e identificación de la micobacteria en los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. NCCLS (actualmente Clinical and Laboratory Standards Institute) *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes. Approved Standard M24-A*, 2003
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad

Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)
2005

URM-F02

Etest® fármacos 1ª y 2ª línea-*M. kansasii*

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Es una técnica cuantitativa para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los antimicrobianos. Consiste en una tira de plástico calibrada con una escala de concentraciones en µg/ml y un código para identificar el antimicrobiano en la cara anterior de la tira, y un gradiente predefinido de concentraciones de antibiótico con 15 diluciones dobles seriadas en la cara posterior de la tira. Cuando se aplica una tira de Etest en una superficie de agar inoculado, el gradiente exponencial preformado de antimicrobiano se transfiere inmediatamente a la matriz de agar. Después de la correspondiente incubación, se forma una elipse simétrica de inhibición centrada a lo largo de la tira. La CMI se lee directamente en la escala en el punto de intersección de la elipse de inhibición con la tira.

El Etest se realiza a demanda según van produciéndose los resultados positivos en los medios de cultivo líquidos.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Mycobacterium kansasii aislado en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

SENSIBLE o RESISTENTE a rifampicina, isoniacida, etambutol, estreptomycin, claritromicina, azitromicina, rifabutina, etionamida, ciprofloxacino, linezolid, doxiciclina, cotrimoxazol, amoxicilina-ácido-clavulánico, moxifloxacino.

TIEMPOS DE RESPUESTA

10-14 días desde el aislamiento e identificación de la micobacteria en los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wanger A, K Mills. *Testing of Mycobacterium tuberculosis susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, Rifampin, and Streptomycin by using Etest*. J. Clin. Microbiol. 1996, 34:1672-1676
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias* 9a. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad

Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)
2005

[URM-G00](#)

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD micobacterias de crecimiento rápido y otras micobacterias no tuberculosas

[INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA](#)

El método recomendado para estas especies es la microdilución en caldo. Sin embargo debe tenerse presente que la CIM en este grupo de microorganismos no representa un valor absoluto. Dada el escaso consenso existente pueden valorarse también otros métodos alternativos.

[REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE:](#) Ninguno.

[REQUISITOS DE LA MUESTRA](#)

Micobacterias de crecimiento rápido y otras micobacterias no tuberculosas aisladas, en los medios de cultivo específicos, a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

[BIBLIOGRAFÍA](#)

1. NCCLS (actualmente Clinical and Laboratory Standards Institute) *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes. Approved Standard M24-A*, 2003
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias* 9a. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

[URM-G01](#)

Microdilución fármacos seleccionados-Micobacterias crecimiento rápido

[INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA](#)

Aunque existen múltiples técnicas que pueden ser empleadas, la microdilución en caldo es la técnica de referencia para estas especies. Esta prueba de sensibilidad determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) de distintos antimicrobianos. El caldo base es Mueller-Hinton o Middlebrook 7H9 al que se le añaden los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de estos microorganismos. La CIM se define como la concentración más baja de antimicrobiano en la que no hay crecimiento bacteriano visible. Sin embargo debe tenerse presente que la CIM en este grupo de microorganismos no

representa un valor absoluto. Dada el escaso consenso existente deberían valorarse también otros métodos alternativos.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Micobacterias de crecimiento rápido y otras micobacterias no tuberculosas aisladas, en los medios de cultivo específicos, a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Mycobacterium _____ (género y especie): SENSIBLE o RESISTENTE a los fármacos analizados.

TIEMPOS DE RESPUESTA

2 semanas desde el aislamiento e identificación de la micobacteria en los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wanger A, K Mills. *Testing of Mycobacterium tuberculosis susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, Rifampin, and Streptomycin by using Etest*. J. Clin. Microbiol. 1996, 34:1672-1676
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias* 9a. Cencenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-G02

Etest® fármacos 1ª y 2ª línea-micobacterias de crecimiento rápido y otras micobacterias no tuberculosas

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Es una técnica cuantitativa para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los antimicrobianos. Consiste en una tira de plástico calibrada con una escala de concentraciones en µg/ml y un código para identificar el antimicrobiano en la cara anterior de la tira, y un gradiente predefinido de concentraciones de antibiótico con 15 diluciones dobles seriadas en la cara posterior de la tira. Cuando se aplica una tira de Etest en una superficie de agar inoculado, el gradiente exponencial preformado de antimicrobiano se transfiere inmediatamente a la matriz de agar. Después de la correspondiente incubación, se forma una elipse simétrica de inhibición centrada a lo largo de la tira. La CMI se lee directamente en la escala en el punto de intersección de la elipse de inhibición con la tira.

El Etest se realiza a demanda según van produciéndose los resultados positivos en los medios de cultivo líquidos.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Micobacterias de crecimiento rápido y otras micobacterias no tuberculosas aisladas, en los medios de cultivo específicos, a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Mycobacterium _____ (género y especie): SENSIBLE o RESISTENTE a rifampicina, isoniazida, etambutol, estreptomycin, claritromicina, azitromicina, rifabutina, etionamida, ciprofloxacino, linezolid, doxiciclina, cotrimoxazol, amoxicilina-ácido clavulánico, moxifloxacino.

TIEMPOS DE RESPUESTA

10-14 días desde la positividad de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wanger A, K Mills. *Testing of Mycobacterium tuberculosis susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, Rifampin, and Streptomycin by using Etest*. J. Clin. Microbiol. 1996, 34:1672-1676
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-H00

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS genotipificación cepas de *Mycobacterium tuberculosis* complex

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

La epidemiología molecular es una ciencia que permite conocer la transmisión, la patogénesis y la etiología de una enfermedad en la población humana. En el campo de las enfermedades infecciosas pretende identificar la asociación de factores de riesgo con la transmisión de la enfermedad que permitan: detectar y confirmar brotes; identificar cepas de importancia en salud pública; conocer la extensión global de los patógenos, entender los mecanismos de virulencia y resistencia de diferentes cepas; mejorar el conocimiento de las dinámicas de transmisión y vías de diseminación de las enfermedades infecciosas; desarrollar estrategias para el tratamiento y la prevención de la enfermedad; así

como la posibilidad de identificar contaminaciones cruzadas en los laboratorios. Es un área del conocimiento conceptualmente multidisciplinar, con aportaciones de la biología molecular, de la medicina clínica, de la bioestadística y de la epidemiología. Es importante no confundir el término *epidemiología molecular* con *métodos moleculares*, éstos hacen referencia exclusivamente a la tecnología empleada para diferenciar genéticamente unas cepas de un determinado microorganismo de otras.

En la actualidad, existen diferentes técnicas que permiten genotipar cepas del complejo tuberculoso, bien de forma directa mediante endonucleasas de restricción, o mediante la amplificación previa de una parte del genoma. RFLP-IS6110, MIRU-VNTR y *Spoligotyping* son en la actualidad las técnicas más empleadas en epidemiología molecular de la tuberculosis. En función de la finalidad que se persiga se podría optar por una u otra. El RFLP-IS6110, por su mayor poder discriminativo, es considerada la mejor herramienta y el patrón oro (*gold standard*) cuando aparece un brote de tuberculosis. El *Spoligotyping* es muy utilizado en estudios filogenéticos en los que se establece la distancia y la evolución de las diferentes familias conocidas hasta ahora así como su distribución geográfica.

A pesar de las ventajas o inconvenientes de una determinada técnica, en la práctica, suele ser habitual trabajar con al menos dos de las tres técnicas, no siendo descartable que en determinadas situaciones incluso sea recomendable utilizar las tres.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Mycobacterium tuberculosis complex aislados en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Los resultados de genotipificación deben interpretarse en el contexto de la base de datos de genotipos identificados en Asturias que forman parte de la Unidad de Referencia Regional de Micobacterias y que están a disposición de la Autoridad sanitaria y de los profesionales sanitarios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM. *Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology*. J Clin Microbiol. 1993 Feb; 31(2):406-409
2. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. *Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology*. J Clin Microbiol. 1997 Apr; 35(4):907-914
3. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P,

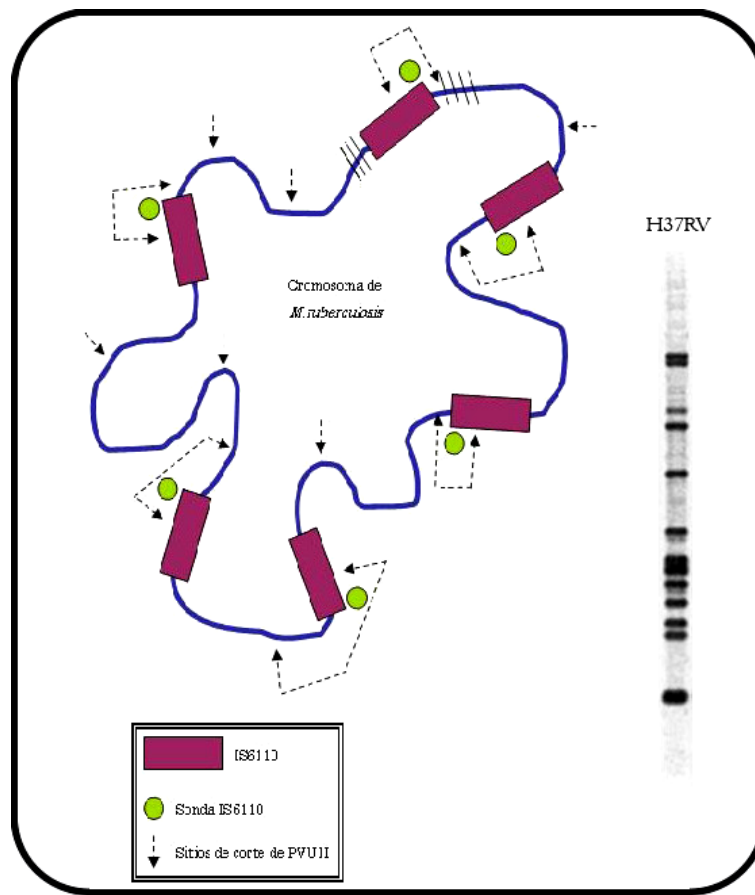
Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D. *Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006 Dec; 44(12):4498-4510

URM-H01

RFLP-IS6110

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

RFLP-IS6110 (*Restriction fragment length polymorphism insertion sequence 6110*). El hecho de que el número de copias de IS6110, y su ubicación dentro del genoma de *M. tuberculosis*, pueda diferir de unas cepas a otras, junto con la estabilidad demostrada en el tiempo, la convierten en una diana de gran utilidad para la epidemiología molecular de la tuberculosis. La secuencia de inserción IS6110 pertenece a la familia de las IS3, tiene 1355 pares de bases. La metodología basada en el número de copias y posición en el genoma de IS6110 se la reconoce como RFLP-IS6110, fue estandarizada en 1993. A partir de ello, se han facilitado las investigaciones a nivel internacional sobre la transmisión de la tuberculosis, pudiendo conocer la distribución mundial de cepas con propiedades especiales como son: la resistencia a fármacos o cepas con mayor grado de infectividad. El rango de aplicaciones reconocido en la literatura de esta herramienta, abarca desde su utilidad para poder diferenciar reinfección de reactivación, al estudio de brotes; o hasta incluso, poder detectar la presencia de infecciones mixtas, o confirmar/descartar contaminaciones intra-laboratorio. La técnica RFLP-IS6110 está considerada como la herramienta con mayor poder discriminativo, y representa al patrón oro (*gold standard*) de la epidemiología molecular de la tuberculosis.



Fundamentos RFLP-IS6110

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Mycobacterium tuberculosis complex aislados en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

RFLP-IS6110: Disponible

Los resultados de genotipificación deben interpretarse en el contexto de la base de datos de genotipos identificados en Asturias que forman parte de la Unidad de Referencia Regional de Micobacterias y que están a disposición de la Autoridad Sanitaria y de los Profesionales sanitarios.

TIEMPOS DE RESPUESTA

De 2-8 semanas desde la positividad de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM. *Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology*. J Clin Microbiol. 1993 Feb; 31(2):406-409

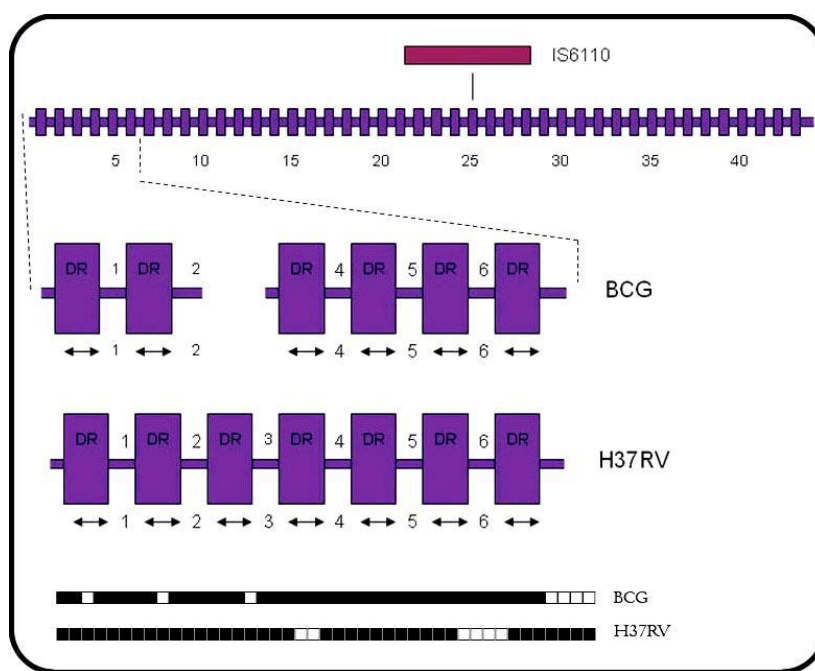
URM-H02

Spoligotyping

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Esta técnica explota los polimorfismos que hay en el locus DR. Este locus forma parte de la familia CRISPR, cuya función es poco conocida. El locus está formado por múltiples DVR (*Direct Variable Repeats*) que a su vez están formadas por una secuencia repetida de 36 pares de bases y una secuencia no repetida (espaciadores) de 34 a 41 pares de bases. Se han identificado 94 espaciadores, pero en la técnica de rutina sólo se utilizan 43. Las cepas varían en el número de espaciadores que están presentes o ausentes. Se amplifica toda la región DR de cada cepa problema y, posteriormente, mediante hibridación se analiza la presencia o ausencia de cada uno de los 43 espaciadores fijados a una membrana. La señal de hibridación se detecta por quimioluminiscencia.

Es el método más simple y rápido, el patrón genético se conforma por la presencia (1) o ausencia (0) de cada uno de los espaciadores estudiados, por lo que puede ser traducido a un código binario de 43 dígitos, éste, a su vez, es susceptible de ser reducido a un código numérico de 15 dígitos (valor octal), lo que lo hace muy manejable para alimentar no solamente las bases de datos de cada laboratorio, o de cada país, sino también bases de datos internacionales, como SpolDB4, en la que se puede consultar si una determinada cepa figura en la base de datos y, si así fuera, conocer la distribución geográfica a nivel mundial de la misma.

Fundamentos del *Spoligotyping*

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Mycobacterium tuberculosis complex aislados en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Spoligotyping: Disponible

Los resultados de genotipificación deben interpretarse en el contexto de la base de datos de genotipos identificados en Asturias que forman parte de la Unidad de Referencia Regional de Micobacterias y que están a disposición de la Autoridad Sanitaria y de los Profesionales sanitarios.

TIEMPOS DE RESPUESTA

2 semanas desde la positividad de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. *Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium*

tuberculosis for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 1997 Apr; 35(4):907-914

[URM-H03](#)

MIRU-VNTR

[INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA](#)

Se basa en el estudio del número de repeticiones en tándem (VNTR, *Variable Numbers of Tandem Repeats*) de una serie de elementos genéticos, de diferente clase, que se encuentran intercalados en el genoma de la micobacteria y que se denominan MIRUs (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*). La genotipificación MIRU-VNTR se basa en la amplificación de las secuencias diana (inicialmente 12 loci, luego 15, y finalmente 24 loci) mediante *primers* específicos para las regiones que flanquean cada locus repetido, y en la determinación del tamaño de los amplicones, lo que se relaciona directamente con el número de copias de cada diana del MIRU-VNTR. Los polimorfismos se generan por adición o delección de estas secuencias repetidas. El tamaño de los amplicones puede determinarse por electroforesis, capilar o en gel, o por cromatografía. Entre 2 y 8 alelos por cada uno de los locus empleados como diana arrojan más de 20 millones de combinaciones posibles. La estabilidad de estas secuencias es superior a 18 meses.

El poder discriminatorio se considera intermedio entre el RFLP-IS6110 y el *Spoligotyping*, técnicamente es más simple que el RFLP-IS6110, los resultados pueden ser convertidos en códigos numéricos característicos de un determinado genotipo, y presenta un elevado potencial de cara a la automatización del procedimiento.

[REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE:](#) Ninguno.

[REQUISITOS DE LA MUESTRA](#)

Mycobacterium tuberculosis complex aislados en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

[INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:](#)

MIRU-VNTR: Disponible

Los resultados de genotipificación deben interpretarse en el contexto de la base de datos de genotipos identificados en Asturias que forman parte de la Unidad de Referencia Regional de Micobacterias y que están a disposición de la Autoridad Sanitaria y de los Profesionales sanitarios.

[TIEMPOS DE RESPUESTA](#)

2 semanas desde la positividad de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Loch C, van Soolingen D. *Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006 Dec; 44(12):4498-4510

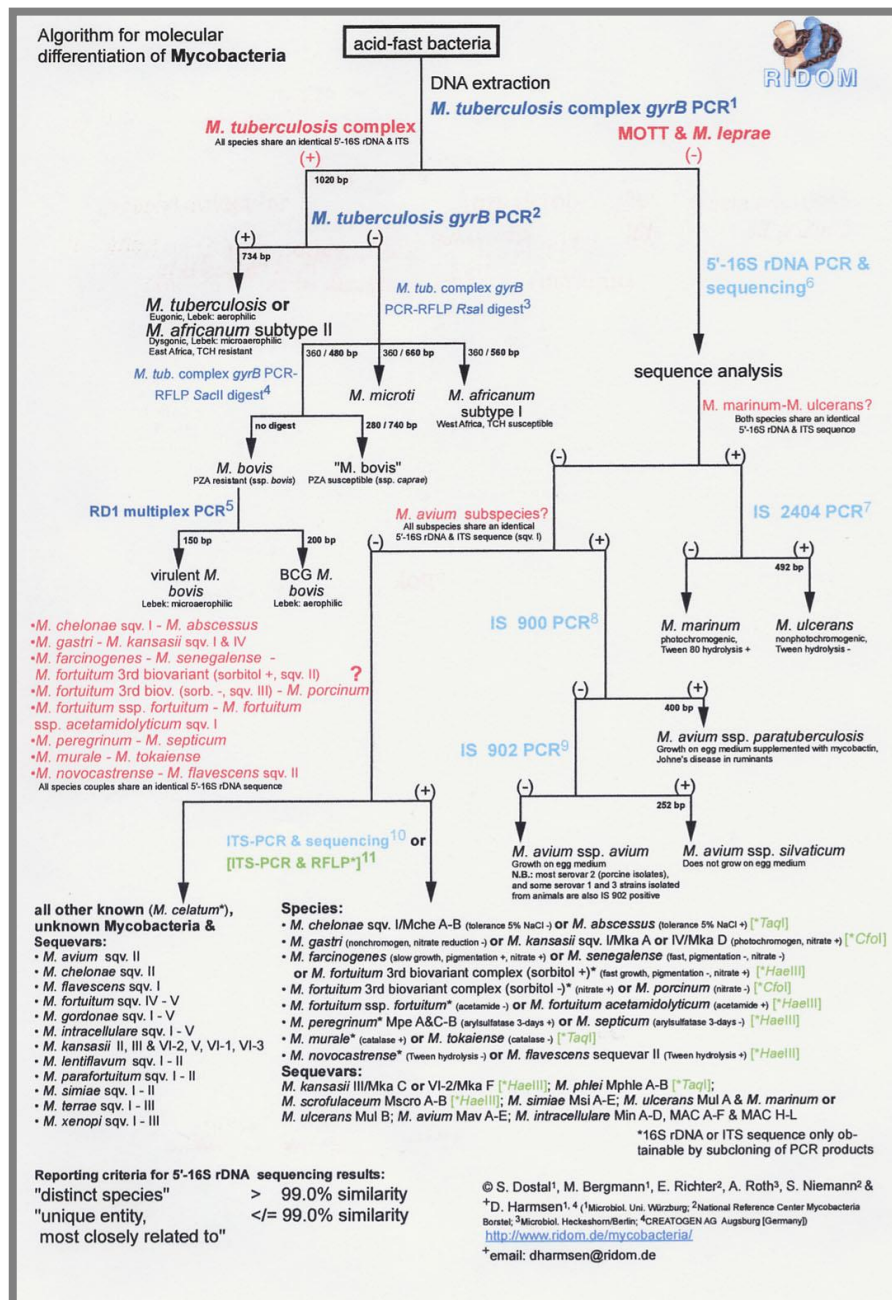
URM-H04

PCR-RFLP gen *gyrB*

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

El complejo tuberculoso está formado por varias especies: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. caprae*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi*, y más recientemente "*M. mungi*" sp. nov. Constituyen un grupo de micobacterias de crecimiento lento que están estrechamente relacionadas a nivel de ADN (homología del 99,95%), contienen idénticas secuencias en el gen 16S rRNA, pero que difieren en términos de fenotipia y de preferencia por una determinada especie hospedadora. El complejo *M. tuberculosis* incluye por un lado cepas adaptadas al humano (*M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. canetti*, siendo este último el más divergente) y por otro cepas adaptadas a animales (*M. bovis* es la principal causa de tuberculosis en otras especies de animales, *M. microti*, *M. pinnipedi*, *M. caprae*, *M. mungi*). Algunos autores no las consideran especies independientes sino subespecies de *M. tuberculosis*.

La secuenciación del gen *gyrB* permitió reconocer polimorfismos entre especies del taxón *M. tuberculosis* que emplearon para la identificación de especies. Kasai *et al.* encontraron cuatro variaciones sinónimas en la secuencia del gen *gyrB* entre las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*; tres de ellas son transiciones y una es una transversión. Aplicando la metodología PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*), se amplifica un fragmento del gen *gyrB* que Introducción, posteriormente se digiere con enzimas de restricción (*RsaI*, *TaqI*, *SacII*) lo que produce un patrón de fragmentos digeridos de longitud polimórfica característicos de una determinada especie.



Dostal S., Bergmann M., Richter E., Roth A., Niemann S., Harmsen D.
<http://www.ridom.de/mycobacteria/>

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Mycobacterium tuberculosis complex aislados en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

PCR-RFLP gen *gyrB*: Realizado

TIEMPOS DE RESPUESTA

2 semanas desde la positividad de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kasai H, Ezaki T, Harayama S. *Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their gyrB sequences*. J Clin Microbiol. 2000; 38:301-308.
2. Roth A., Reischl U., Streubel A., Naumann L., Kroppenstedt R.M., Habicht M, Fischer M., and Mauch H. *Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases*. J. Clin. Microbiol. 2000, 38:1094-1104

URM-H05

PCR región RD1

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Método de diferenciación de especies del complejo *M. tuberculosis* que fue descrito por Max Salfinger *et al.* 2002 para determinar la presencia o ausencia de 6 regiones específicas denominadas Regiones de Diferencia (RD): RD1, RD9 y RD10 para el cribado inicial, y en aquellas en las que todavía no se puede determinar la especie, se analizan 3 regiones más: RD3, RD5 y RD11.

Detección presencia región RD1, se pueden diferenciar las subespecies de *M. bovis* (*M. bovis* y *M. caprae* y *M. bovis* BCG). La región RD1 está delecionada únicamente en *M. bovis* BCG y se encuentra presente en todas las demás especies del taxón.

<i>Mycobacterium spp</i>	Regiones de Diferencia					
	RD1 ^{BCG}	RD4	RD9	RD12	RD1 ^{mic}	RD2 ^{seal}
<i>M. canetti</i>	P	P	P	A	P	P
<i>M. tuberculosis</i>	P	P	P	P	P	P
<i>M. africanum</i>	P	P	A	P	P	A
<i>M. microti</i>	P	P	A	P	A	P
<i>M. pinnipedii</i>	P	P	A	P	P	A
<i>M. caprae</i>	P	P	A	A	P	P
<i>M. bovis</i>	P	A	A	A	P	P
<i>M. bovis</i> BCG	A	A	A	A	P	P
<i>M. mungi</i>	P	P	A	P	P	P

Presencia (P) o ausencia (A), *mediante amplificación-PCR, de las regiones de diferencia (RD) en las especies incluidas en el taxón *M. tuberculosis* complex (5). RD1^{BCG}: RD1-*M. bovis* BCG-específica; RD1^{mic}: RD1- *M. microti*-específica; RD2^{seal}: RD2-*M. pinnipedii*-específica.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Mycobacterium tuberculosis complex aislados en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

PCR Región RD1: Realizado

TIEMPOS DE RESPUESTA

2 semanas desde la positividad de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Talbot E.A., Williams D.L., Frothingham R. *PCR identification of Mycobacterium bovis BCG*. J Clin Microbiol. 1997; 35:566-569
2. Parsons L.M., Brosch R., Cole S.T., Somoskövi A., Loder A., Bretzel G., Van Soolingen D., Hale Y.M. and Salfinger M. *Rapid and simple approach for identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis*. J Clin Microbiol. 2002; 40:2339-2345.
3. Roth A., Reischl U., Streubel A., Naumann L., Kroppenstedt R.M., Habicht M, Fischer M., and Mauch H. *Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases*. J. Clin. Microbiol. 2000, 38:1094-1104

URM-H06

PCR región RD9

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Método de diferenciación de especies del complejo *M. tuberculosis* para determinar la presencia o ausencia de 6 regiones específicas denominadas Regiones de Diferencia (RD). En este caso detección presencia región RD9, si la región RD9 está conservada en el genoma se amplificará un fragmento de 306 pb, mientras que en el caso de que esté delecionada amplificará un fragmento de 206 pb. Un 25% de los *M. africanum* tipo I conservan en su genoma la región RD9.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Mycobacterium tuberculosis complex aislados en los medios de cultivo específicos para micobacterias a partir de las muestras clínicas que son remitidas regularmente

al laboratorio y que cumplen las condiciones generales comentadas con anterioridad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

PCR Región RD9: Realizado

TIEMPOS DE RESPUESTA

2 semanas desde la positividad de los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Parsons L.M., Brosch R., Cole S.T., Somoskövi A., Loder A., Bretzel G., Van Soolingen D., Hale Y.M. and Salfinger M. *Rapid and simple approach for identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis*. J Clin Microbiol. 2002; 40:2339-2345.

URM-100

DIAGNÓSTICO DE LA LEPROA

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Mycobacterium leprae es el agente causal de la lepra, una enfermedad crónica de carácter granulomatoso que afecta a la piel y a los nervios periféricos. Presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas. En la forma tuberculoide las lesiones son más localizadas y la presencia de bacilos es escasa, mientras que en la forma lepromatosa las lesiones son más generalizadas y la presencia de bacilos es mayor. Existen múltiples estadios intermedios entre ambas formas de lepra. El diagnóstico suele basarse en la clínica y en la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes en el material tomado de las lesiones cutáneas, nerviosas, o en linfa extraída del lóbulo de la oreja. Esta micobacteria no se puede cultivar *in vitro* en los medios habituales. Las técnicas de amplificación genómica (PCR) para la detección e identificación de *M. leprae* han supuesto un importante avance para el diagnóstico de esta enfermedad.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Muestras representativas de las lesiones cutáneas o de biopsia de nervios afectados, así como linfa extraída del lóbulo de la oreja.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pfyffer G.E. and Palicova F. 2011. *Mycobacterium: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures*, en: Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. ASM Press, Washington D.C.

2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias* 9a. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-I01

Genotype LepraeDR[®]

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Genotype LepraeDR está basado en la tecnología DNA.STRIP[®] permite la identificación de *M. leprae* y a la vez analizar la resistencia a rifampicina, quinolonas y dapsona. Para determinar la resistencia a la rifampicina se investigan las mutaciones más significativas en el gen *rpoB*, en el caso de las quinolonas las del gen *gyrA*, y en el de la dapsona las una región del gen *folP1*. Esta prueba está validada para muestras de biopsia de piel en las que hayan visualizado bacilos ácido-alcohol resistentes.

El procedimiento completo se divide en tres pasos: aislamiento de DNA procedente de cultivo (placas de cultivo/medio líquido) o de material directo (muestras pulmonares baciloscopia positiva decontaminadas), una amplificación múltiplex con *primers* marcados con biotina, y una hibridación reversa.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Muestras representativas de las lesiones cutáneas o de biopsia de nervios afectados, así como linfa extraída del lóbulo de la oreja.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Genotype LepraeDR: Positivo

Genotype LepraeDR: Negativo

Table 1: Mutations in the gene *rpoB* and corresponding wild type and mutation probes (modified according to Cambau *et al.* 2002, Clin. Infect. Dis. 34: 39-45, Mada *et al.* 2001, Antimicrob. Agents Chemother. 45: 3635-3639, Scollard *et al.* 2006, Clin. Microbiol. Rev., 19: 338-381)

failing wild type probe(s)	codons analyzed	appearing mutation probe	mutation
<i>rpoB</i> WT1	429-434		G432S*
<i>rpoB</i> WT2	437-442		Q438V* F439/M440 KF insertion* D441N* D441Y*
<i>rpoB</i> WT3	449-455	<i>rpoB</i> MUT1	H451Y H451D* H451V*
<i>rpoB</i> WT4	455-459	<i>rpoB</i> MUT2	S456L S456M* S456F* S456W* L458V* L458P*

* This rare mutation has only been detected theoretically (*in silico*) yet. It is therefore possible that it cannot be detected *in vitro*.

Table 2: Mutations in the gene *gyrA* and corresponding wild type and mutation probes (numeration according to *M. leprae* genome)

failing wild type probe	codons analyzed	appearing mutation probe	mutation
<i>gyrA</i> WT	89		G89C*
	91	<i>gyrA</i> MUT	A91V

* This rare mutation has only been detected theoretically (*in silico*) yet. It is therefore possible that it cannot be detected *in vitro*.

Table 3: Mutations in the gene *folP1* and corresponding wild type and mutation probes (numeration according to *M. leprae* genome)

failing wild type probe	codons analyzed	appearing mutation probe	mutation
<i>folP1</i> WT1	53		T53A T53R* T53I*
	55	<i>folP1</i> MUT	P55L P55R*

* This rare mutation has only been detected theoretically (*in silico*) yet. It is therefore possible that it cannot be detected *in vitro*.

TIEMPOS DE RESPUESTA

1 semana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pfyffer G.E. and Palicova F. 2011. *Mycobacterium: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures*, en: Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. ASM Press, Washington D.C.
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005

URM-I02

PCR Nested *M. leprae*-specific repetitive element (RLEP)

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Técnica basada en la amplificación, mediante nested-PCR, de un elemento repetitivo específico de *Mycobacterium leprae* (RLEP).

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Muestras representativas de las lesiones cutáneas o de biopsia de nervios afectados, así como linfa extraída del lóbulo de la oreja.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

PCR-RLEP *M. leprae*: Positivo

PCR-RLEP *M. leprae*: Negativo

TIEMPOS DE RESPUESTA

1 semana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Donoghue H.D., Holton J., and Spigelman M. *PCR primer that can detect low levels of Mycobacterium leprae DNA*. J. Med. Microbiol. 2001, 50:177-182

URM-I03

PCR Nested gen Ag 18-kDa *M. leprae*

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Técnica basada en la amplificación, mediante nested-PCR, del gen que codifica el Ag 18-kDa de *Mycobacterium leprae*.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Muestras representativas de las lesiones cutáneas o de biopsia de nervios afectados, así como linfa extraída del lóbulo de la oreja.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

PCR nested gen Ag 18-kDa *M. leprae*: Positivo

PCR nested gen Ag 18-kDa *M. leprae*: Negativo

TIEMPOS DE RESPUESTA

1 semana

BIBLIOGRAFÍA

1. Donoghue H.D., Holton J., and Spigelman M. *PCR primer that can detect low levels of Mycobacterium leprae DNA*. J. Med. Microbiol. 2001, 50:177-182

URM-J00

DIAGNÓSTICO DE LA ÚLCERA DE BURULI (*M. ulcerans*)

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Mycobacterium ulcerans es el agente causal de la úlcera de Buruli, una enfermedad caracterizada por la aparición de lesiones ulcerativas necrotizantes de carácter crónico y progresivo, de consecuencias devastadoras, que pueden requerir tratamiento quirúrgico dejando importantes secuelas. El diagnóstico presuntivo suele apoyarse en la clínica ya que, habitualmente, la visualización al microscopio de bacilos ácido-alcohol resistentes en el material tomado de las lesiones cutáneas tiene baja sensibilidad. El cultivo del microorganismo (de crecimiento extremadamente lento) es laborioso y puede requerir varios meses. Las técnicas de amplificación genómica (PCR) para la detección e identificación de *M. ulcerans* han supuesto un importante avance para la confirmación diagnóstica de esta enfermedad.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Muestras representativas de las lesiones cutáneas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pfyffer G.E. and Palicova F. 2011. *Mycobacterium: General characteristics, laboratory detection, and staining procedures*, en: Versalovic J., Carroll K.C., Funke G., Jorgensen J.H., Landry M.L., Warnock D.W. (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 10th ed. ASM Press, Washington D.C.
2. Alcaide F., Esteban Moreno J., González Martín J., Palacios Gutiérrez J.J. *Procedimientos en Microbiología Clínica: Micobacterias 9a*. Cercenado E., Cantón R. (eds.). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2005
3. Ross B.C., Marino L., Oppedisano F., Edwards R., Robis-Browne R.M., Johnson P.D.R., Development of a PCR assay for rapid diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection. J. Clin. Microbiol. 1997, 35: 1696-1700
4. Stinear T., Ross B.C., Davies J.K., Marino L., Robins-Browne R.M., Oppedisano F., Sievers A., Johnson P.D.R. *Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of Mycobacterium ulcerans by PCR*. J. Clin. Microbiol. 1999, 37: 1018-1023

URM-J01

PCR Nested IS2404 *M. ulcerans*

INFORMACIÓN CLÍNICA – UTILIDAD CLÍNICA

Técnica basada en la amplificación, mediante nested-PCR, de un elemento repetitivo específico (IS2404) de *Mycobacterium ulcerans*.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE: Ninguno.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Muestras representativas de las lesiones cutáneas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

PCR Nested IS2404 *M. ulcerans*: Positivo

PCR Nested IS2404 *M. ulcerans*: Negativo

TIEMPOS DE RESPUESTA

1 semana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stinear T., Ross B.C., Davies J.K., Marino L., Robins-Browne R.M., Oppedisano F., Sievers A., Johnson P.D.R. *Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of Mycobacterium ulcerans by PCR*. J. Clin. Microbiol. 1999, 37: 1018-1023
2. Portaels F., Meyers W.M., Ablordey A., Castro A.G., Chemlal K., de Rijk P., Elsen P., Fissette K., Fraga A.G., Lee R., Mahrous E., Small P.L.C., Stragier P., Torrado E., Van Aerde A., Silva M.T., Pedrosa J. *First cultivation and characterization of Mycobacterium ulcerans from the environment*. PLoS Negl. Trop. Dis. 2(3): e178. Doi:10.1371/journal.pntd.0000178
3. Stienstra Y., van der Werf T., Guarner J., Raghunathan P.L., Spotts Whitney E.A., van der Graaf W.T.A., Asamoah K., Tappero J.W., Ashford D.A., King C.H. *Analysis of an IS2404-based Nested PCR for diagnosis of Buruli ulcer disease in regions of Ghana where the disease is endemic*. J. Clin. Microbiol. 2003, 41: 794-797