

**Diagnóstico
Microbiológico
de las Enfermedades
Producidas por
Micobacterias**

Género *Mycobacterium*

Características

- Bacilos. Ligeramente curvados. Aerobios
- Inmóviles. No forman esporas. Gram positivos
- Algunas especies producen pigmentos
- Tiempo de generación: 2 a >20 horas*
- Temperatura óptima de crecimiento: 30-45° C.*

* Dependiendo de la especie

Género *Mycobacterium*

Características

■ Pared celular

- Tiene un alto contenido lipídico, incluyendo ácidos micólicos

■ Acido alcohol resistencia:

- Base de las técnicas de tinción: Ziehl-Neelsen
- Tras la aplicación de colorantes, las micobacterias no se decoloran por la acción del ácido-alcohol. Característica que varía en intensidad según la especie y la fase de crecimiento

Género *Mycobacterium*

Clasificación

- Tradicionalmente las micobacterias se han clasificado teniendo en cuenta su velocidad de crecimiento y la capacidad para producir pigmentos en presencia/ausencia de luz

Género *Mycobacterium*

Clasificación

■ Velocidad de crecimiento:

- Crecedores lentos (>7 días): *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, MAC, ...
- Crecedores rápidos (<7 días): Complejo *M. fortuitum*, ...

■ Fotoreactividad

- Fotocromógenas: Requieren luz para formar pigmentos (*M. kansasii*, ...)
- Escotocromógenas: Forman pigmento en la oscuridad (*M. gordonae*, ...)
- No cromógenas: No forman pigmentos

Género *Mycobacterium*

Clasificación

- *Mycobacterium leprae* (no cultivable)

- A) Micobacterias tuberculosas: Complejo "*M. tuberculosis*"
 - *M. tuberculosis*
 - *M. bovis*
 - *M. africanum*, *M. microti*

- B) Micobacterias no tuberculosas: MNT, *M. atípicas* o *M. ambientales*
 - Velocidad de crecimiento: Lento/rápido
 - Producción de pigmento

Género *Mycobacterium*

Significado clínico y hábitat natural

- El género *Mycobacterium* incluye:
 - Parásitos obligados. v.g. *M. tuberculosis*
 - Saprofitos. v.g. *M. smegmatis*
 - Patógenos oportunistas. v.g. *M. avium intracellulare* (MAC)
- *M. tuberculosis* y *M. leprae* sólo se encuentran en tejidos de animales de sangre caliente
- La mayoría de las especies pueden aislarse del suelo y del agua

Tuberculosis

- Enfermedad producida por micobacterias del complejo "*M. tuberculosis*"
 - *M. tuberculosis*
 - *M. bovis*
 - *M. africanum, M. microti*

Diagnóstico microbiológico

1 Sospecha diagnóstica

- Indicación de estudio microbiológico

2 Diagnóstico microbiológico*

- Recogida de la muestra
- Transporte
- Procesamiento
- Técnicas de diagnóstico rápido: Tinciones, ...
- Cultivos: Identificación de la especie
- Estudio de sensibilidades

* Los procedimientos diagnósticos en el laboratorio deben realizarse en condiciones de bioseguridad adecuadas

Diagnóstico microbiológico

- La calidad del informe del laboratorio de microbiología depende, inicialmente, de la calidad de la muestra clínica remitida

Recogida de la muestra

Normas generales

- **Las muestras deben recogerse si es posible, antes de que el enfermo inicie el tratamiento**
 - Recipiente estéril de material plástico transparente y desechable
 - Boca ancha y cierre hermético
 - Las muestras deben estar perfectamente identificadas
 - Datos del paciente
 - Tipo de muestra y modo de obtención

Transporte de la muestra

Normas generales

- **Las muestras se deben llevar al laboratorio lo antes posible**
 - Especialmente importante en muestra de jugo gástrico
 - Hasta su envío, deben mantenerse refrigeradas (4° C.) y protegidas de la luz
- **No recoger muestra de 24 horas**
- **Cuidado: Contaminación por micobacterias saprófitas del agua**

Recogida y transporte de la muestra

■ Si existen dudas sobre:

- Tipo de muestra a tomar
- Método de obtención
 - Especialmente si se van a utilizar técnicas agresivas
- Cómo transportarla

Consultar con expertos

Muestra respiratoria: Esputo

- **En el diagnóstico de TB, el esputo es la mejor muestra del tracto respiratorio**
 - Recogida en zona ventilada (formación de aerosoles)
 - Tres muestras consecutivas
 - Preferentemente matutinas. En ayunas
 - No usar antisépticos
 - Evitar recogida de saliva
 - Envase y etiquetado adecuado

Otras muestras respiratorias

■ **Esputo inducido**

- En ayunas
- Inducción con suero fisiológico templado o mezclado con glicerol
- Obtención en zona acondicionada (producción de aerosoles)

■ **Jugo gástrico**

- Secreciones del tracto respiratorio deglutidas
- Paciente ingresado. Niños
- En ayunas. Procesamiento urgente de la muestra

■ **Otras técnicas**

- Aspirado y cepillado bronquial, biopsia transbronquial, ...

Muestra: Orina

- **Instrucciones similares a las del cultivo de orina**
 - Primera orina de la mañana
 - Limpieza genital previa
 - Mitad de la micción
 - Tres muestras
 - Volumen >40 mL
 - Transporte inmediato o refrigerar en nevera

Tinciones o Baciloscopia: Generalidades

- Las micobacterias son bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR)
- Procedimiento más rápido y barato para el diagnóstico presuntivo de enfermedades producidas por micobacterias
- Fundamento: Envoltura lipídica que impide la acción del decolorante alcohol-ácido

Tinciones: Muestra

- Cualquier tipo de muestra
- Evitar aquellas que pueden estar colonizadas por micobacterias saprofitas (heces y exudado vaginal)
- Seleccionar la parte más representativa
- Concentrado de la muestra si es preciso
- Cuidado con el agua de los grifos (MNT)
 - Principal causa de falsos positivos

Tinciones: Tipos

■ Ziehl-Neelsen

- Microscopio óptico. Inmersión. 800-1.000 aumentos
- Bacilos de color rojo sobre fondo azul y blanco

■ Auramina O

- Microscopio de fluorescencia. 200-400 aumentos
- Bacilos fluorescentes amarillos y brillantes sobre fondo oscuro

Tinciones: Aplicaciones

■ Diagnóstico de rutina en muestras clínicas

- Preferible tinción de Auramina
 - Lectura más rápida y completa
 - Menor cansancio del observador
 - Mayor sensibilidad

■ Comprobación de BAAR de cultivos

- Preferible Ziehl-Neelsen
 - Algunas cepas del complejo *M. fortuitum* y *chelonae* no cogen la tinción de auramina

Tinciones: Informe

Información del resultado inmediata: <24 horas tras la recepción de la muestra

■ Aspectos cualitativos

- "Cord factor" en muestras de orina: Muy sugestivo de *M. tuberculosis*
- Bacilos largos y teñidos en franjas: Sugestivo de *M. kansasii*
- Formas cocobacilares e hipocrómicas: Sugestivo complejo MAC

Tinciones: Informe

■ Aspectos cuantitativos

- Muestra respiratoria:
 - Permite una primera aproximación a la respuesta al tratamiento. No obstante, la evolución microbiológica debe basarse en el cultivo
- Varios esquemas
 - NTA: En cruces (+, ++ o +++)
 - UICT: Bacilos/largo de lámina de la extensión
 - Otros: BAAR/100 campos de inmersión

Tinciones: Valoración

- **Una tinción positiva sólo nos indica la presencia de bacterias ácido alcohol resistentes (BAAR+)**
 - Lo más probable es que se trate de una micobacteria, pero no siempre
- **La valoración de la misma dependerá del tipo de muestra analizada (esputo, orina, ...) y del tipo y situación del paciente**

Tinciones: Valoración

Esputo

- El valor predictivo positivo de una tinción positiva de esputo para el diagnóstico de TB es $>90\%$
- Debe ser valorada inicialmente en todos los pacientes como diagnóstico de probabilidad de enfermedad tuberculosa, realizándose el aislamiento respiratorio adecuado

Tinciones: Valoración

Orina

- El valor predictivo positivo de una tinción positiva en orina para el diagnóstico de TB es inferior al del esputo
- Debe ser valorada inicialmente en cada paciente de forma individualizada, en función de la clínica y la situación del enfermo

Tinciones: Valoración

En paciente VIH (-)

- **Una tinción positiva es valorable, y**
 - Sugestiva de *M. tuberculosis* en:
 - Muestras respiratorias
 - Orina con "cord factor" positivo
 - Biopsias
 - Punción ganglionar en >14 años
 - Líquidos de serosas: LCR, L. pleural, ...
 - Sugestiva de *M. tuberculosis* o MNT:
 - Punción o biopsia ganglionar <14 años
 - Muestras de piel

Tinciones: Valoración

En paciente VIH (+)

- **Inicialmente, una tinción positiva en cualquier muestra clínica debe ser valorada como significativa. En función de la situación clínica y del tipo de muestra corresponderá:**
 - *M. tuberculosis*, o
 - MNT (complejo MAC, ...)
 - La incidencia de enfermedad por MAC es variable según las regiones

Tinciones: Limitaciones en el diagnóstico de Tuberculosis

- **Sensibilidad limitada: Falsos negativos**
 - Para que la tinción sea positiva se necesitan al menos entre 5.000 y 10.000 bacilos por mL de muestra
- **Especificidad limitada: Falsos positivos**
 - Una tinción positiva puede corresponder a *M. tuberculosis*, ser una MNT y ocasionalmente, incluso, no ser una micobacteria
 - Durante el tratamiento, pueden observarse baciloscopias positivas con cultivo negativo (bacilos inviables)
- **No informa sobre la sensibilidad a los fármacos**

Cultivos

- **Dadas las limitaciones de las técnicas de tinción, es ineludible realizar siempre técnicas de aislamiento (cultivos) en todas las muestras en que se solicite un estudio de micobacterias**

Cultivos: Utilidad

- Establecer un diagnóstico de certeza
- Identificación de especie
 - Complejo *M. tuberculosis*: *M. tuberculosis* o *M. bovis*
 - MNT: MAC, *M. kansasii*, ...
- Estudio de sensibilidades

Medios de Cultivo

■ Medios sólidos

- Con base de huevo: Lowenstein Jensen, Coletsos, ...:
 - Preferibles para aislamiento inicial
- Sin base de huevo: 7H10, 7H11 de Middlebrook
 - Se utilizan más para estudio de sensibilidades

■ Medios líquidos

- Sistemas monitorizados y automatizados
- Radiométricos (Bactec 460)
- No radiométricos (ESP, Bactec 9.000, MB/Bact, MIGT)
- Detección de crecimiento más precoz que con los medios sólidos
- Estudio de sensibilidades

Medios de Cultivo

Incubación y lectura

■ Medios sólidos

- A 36 grados, durante 8 semanas
- Muestras especiales a 30 grados (piel, ganglios):
M. marinum y *M. malmoense*
- Puede ser útil incubar en atmósfera rica en CO₂
- Lectura 1 ó 2 veces por semana

■ Medios líquidos

- Sistemas no radiométricos automatizados:
Lecturas automáticas cada 30-60 minutos

Cultivos: Identificación de la especie

■ Patrón fenotípico

- Crecimiento
 - Medio en el que crece. Tiempo que tarda en crecer, morfología de la colonia, producción de pigmentos con/sin luz, ...
- Pruebas bioquímicas
 - Prueba de la niacina, reducción de nitratos, catalasa, ...

■ Estudio genotípico

- Sondas de DNA
 - Técnica rápida
 - Permite identificar si pertenece o no al complejo tuberculosis

Cultivos: Identificación de la especie

- La aplicación de sondas de DNA constituye en la actualidad la técnica rápida de elección para la identificación de una micobacteria aislada en una muestra clínica como perteneciente al complejo tuberculosis, MAC, o *M. kansasii*

Cultivos: Valoración

Aislamiento de *M. tuberculosis*

- Siempre es valorable
- Criterio de certeza de enfermedad TB
- Posibles errores:
 - Contaminación del cultivo en el laboratorio
 - Muestra procedente de otro enfermo

Cultivos: Valoración

Aislamiento de MNT

- **La valoración dependerá del tipo de paciente, de la clínica, de la muestra y de la micobacteria aislada**
 - Muestra no contaminada (v.g. LCR) ⇒ Siempre valorable
 - Muestras contaminadas (v.g. esputo)
 - Significado dependiente de:
 - Clínica. Patología de base (VIH, ...)
 - Especie de micobacteria. Hallazgo aislado o repetido
 - Lesiones anatomopatológicas compatibles, ausencia de otra etiología, ...
 - Consultar con experto

Cultivos: Valoración

- Aislamiento de MNT en paciente VIH (-)
 - En enfermos inmunocompetentes habitualmente carece de significado, salvo que sea un hallazgo que se repita en muestras sucesivas, exista clínica compatible y especialmente, si además, se acompaña de alteraciones histopatológicas

Cultivos: Valoración

■ Aislamiento de MNT en paciente VIH (+)

- En enfermos con infección por VIH, y especialmente si se acompaña de inmunodepresión severa (< de 100 CD4), el aislamiento de micobacterias del complejo *M. avium intracelulare* (MAC) se correlaciona con frecuencia con patología clínica

Estudio de sensibilidades

Métodos convencionales

- **Crecimiento de la micobacteria en medios con el tuberculostático correspondiente**
- **Medios sólidos: Método de las proporciones**
 - Resultado del estudio: 2-3 meses desde la recogida de la muestra clínica
- **Medios líquidos (Bactec radiométrico, MB-Bact, ESP)**
 - Obtención del resultado en menos tiempo

Métodos experimentales. Técnicas rápidas

Estudio de sensibilidades

¿Cuándo realizarlo?

- **Al menos, en micobacterias procedentes de enfermos:**
 - Tratados previamente: Retratamientos
 - Con fracaso terapéutico
 - Con mala evolución clínica
 - Con infección por VIH
 - Con sospecha clínica o epidemiológica de multirresistencia
 - En brotes
- **Vigilancia epidemiológica de las resistencias**

Técnicas rápidas en muestras clínicas

■ Diagnóstico de presunción

- Técnicas de tinción clásicas
 - De elección actualmente
- Sondas de DNA
 - Se requiere $>10^5$ bacterias en la muestra a estudiar
 - No son útiles en muestras clínicas. Sólo aplicables a cultivos
- Técnicas de amplificación genética
 - En fase experimental. En la actualidad no son el estandar asistencial

Diagnóstico Microbiológico de la Tuberculosis

Problemas

- **Limitaciones de las técnicas de tinción**
- **Tiempo. Se necesitan semanas para:**
 - El aislamiento e identificación de la bacteria
 - La detección de resistencia a los fármacos

Diagnóstico Microbiológico de la Tuberculosis

Se deben incorporar técnicas que permitan:

- La detección directa de micobacterias en muestras clínicas, con mayor sensibilidad y especificidad
- Acortar el tiempo para aislar e identificar la bacteria
- Detectar rápidamente la presencia de resistencias