

USAM-ANLIS

MAGISTER EN MICROBIOLOGIA MOLECULAR

Tesis de Maestría

**Genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis*
para la vigilancia de contaminación cruzada
en laboratorios de la Red Nacional de Tuberculosis**

Alumno: Bioquímica Valeria Alonso

Director: Dra. Viviana Ritacco

2009

*A Juan Manuel por su cariño y apoyo incondicional
y a mis hijos Felipe y Luciano por su paciencia durante la ejecución de este trabajo*

ÍNDICE

RESUMEN	3
OBJETIVOS	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos.....	4
INTRODUCCIÓN	5
Situación de la tuberculosis.....	5
En el mundo, en la región	5
En la Argentina.....	5
Patogenia.....	5
Características de <i>M. tuberculosis</i>	6
Diagnóstico de laboratorio	9
Microscopía.....	9
Cultivo.....	10
Identificación fenotípica de <i>M. tuberculosis</i>	12
Identificación genotípica.....	13
Detección de resistencia a drogas	15
Antecedentes del problema a investigar	19
Causas de la contaminación cruzada	19
Consecuencias	21
Criterios para la confirmación	21
Las bases moleculares de la genotipificación	22
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Aislamientos.....	26
Genotipificación.....	27
RFLP IS6110.....	27
Spoligotyping	31
DRE-PCR.....	33
Análisis computarizado de genotipos	33
RESULTADOS	34
Hospital I.....	34
Hospital II.....	36
Hospital III.....	39
Hospital IV.....	42
Hospital V	43
Hospital VI.....	44
Hospital VII.....	45
Hospital VIII.....	47
Hospital IX.....	48
Hospital X	48
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	54
AGRADECIMIENTO	54
REFERENCIAS	55

RESUMEN

El diagnóstico bacteriológico de tuberculosis incluye una serie de complejos pasos que van desde la obtención de la muestra clínica hasta la identificación bacteriológica del bacilo. Es probable que en alguno de estos pasos se produzca una contaminación cruzada por transferencia accidental de bacilos de una muestra altamente positiva a la o las procesadas subsecuentemente. Generalmente este error pasa inadvertido en la rutina de trabajo. La consiguiente aparición de falsos cultivos positivos puede inducir al diagnóstico erróneo de tuberculosis, la instauración de tratamientos prolongados e innecesarios con drogas potencialmente tóxicas, la distracción de recursos del sistema de salud y a la distorsión de resultados de los análisis epidemiológicos. La confirmación de un evento de contaminación cruzada requiere confrontar resultados bacteriológicos, clínicos, epidemiológicos y de genotipificación. Esta última es la única herramienta disponible en el laboratorio para confirmar un episodio de contaminación y tiene el mérito agregado de haber puesto el tema en evidencia a nivel global.

En el presente trabajo, se analizaron 28 episodios de contaminación cruzada ocurridos entre 1996 y 2003 que involucraron el análisis de un total de 115 aislamientos derivados de 10 laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis. Las técnicas de genotipificación utilizadas fueron RFLP IS6110, spoligotyping y DRE-PCR. La contaminación cruzada de muestras se confirmó en al menos una de las muestras sospechadas en 23 de los 28 episodios investigados. En los restantes cinco episodios, se descartó la posibilidad de contaminación de acuerdo a los perfiles genéticos apoyados por la información bacteriológica, los registros de laboratorio y los datos clínico-epidemiológicos de los pacientes.

Las tres técnicas de genotipificación mostraron resultados concordantes y fueron útiles en la caracterización de los episodios de contaminación cruzada de laboratorio. DRE-PCR (*double repetitive element-PCR*) mostró ser una técnica rápida, sencilla y de bajo costo. Sin embargo en el transcurso de nuestro estudio comprobamos que los resultados suelen ser poco reproducibles y, en ocasiones, poco claros. El spoligotyping demostró ser un método rápido y reproducible que permitió descartar una contaminación si los patrones resultaban diferentes pero no confirmarla si resultaban idénticos porque tiene bajo poder de discriminación. El RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) IS6110 fue el método confirmatorio por excelencia pero es muy laborioso, artesanal y caro y además se demora alrededor de dos meses hasta la obtención de resultados.

En suma, se demostró la ocurrencia de contaminación cruzada de muestras en todos los laboratorios de la red que colaboraron en la investigación, incluyendo centros con alta, mediana y baja carga de trabajo. La contaminación ocurrió independientemente del sistema de cultivo empleado y se pudo inferir que los factores más favorables a este tipo de errores fueron viales y/o reactivos empleados en el procedimiento de decontaminación de muestras clínicas de sitios no estériles y, en el sistema radiométrico de cultivo (ahora en desuso), fallas del sistema de incineración de la aguja.

El alerta, la alta capacitación y la actitud abierta y colaborativa de los bacteriólogos de la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis involucrados en el estudio resultaron cruciales para realizar la investigación integral de los eventos descritos y confirmar o descartar la sospecha de contaminación cruzada de muestras en cada uno de ellos.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, contaminación cruzada de laboratorio, genotipificación.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la utilidad de la genotipificación intra-especie de *Mycobacterium tuberculosis* en la confirmación de sospecha de contaminación cruzada de laboratorio y en la vigilancia de su ocurrencia en laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis.

Objetivos específicos

- Caracterizar presuntos episodios de contaminación cruzada de muestras en laboratorios de tuberculosis mediante el análisis genotípico de los aislamientos, la investigación de los antecedentes clínico-epidemiológicos y los registros de los laboratorios de origen de las muestras.
- Identificar procedimientos de riesgo para la contaminación cruzada de muestras en el laboratorio de micobacteriología.

INTRODUCCIÓN

Situación de la tuberculosis

En el mundo, en la región

Mycobacterium tuberculosis, el microorganismo causante de una de las enfermedades humanas más antiguas, aún sigue produciendo enfermedad y muerte en vastas áreas del mundo. Según la Organización Mundial de la Salud, en 2006 hubo 9,2 millones de casos nuevos de tuberculosis en el mundo y la enfermedad provocó la muerte de 1,7 millones de personas, entre ellas 700.000 infectadas por el VIH (WHO 2008).

En ocasión del día mundial de la tuberculosis, la directora de la OPS, Dra. Mirta Roses Periago, informó que en 2005 los países de las Américas reportaron un total de 227.000 nuevos casos. En esta región, cada hora se presentan 40 nuevos casos y cada 10 minutos una persona muere por tuberculosis, con el agravante que al menos 7 de cada 10 personas afectadas por este mal en los países en desarrollo son aquellas comprendidas en edades económicamente activas, entre los 15 y los 54 años de edad (PAHO/WHO 2007).

En la Argentina

Todos los años, alrededor de 10.000 nuevos casos de tuberculosis son detectados en la República Argentina y 800 personas mueren a causa de esta enfermedad. Dado que más de la mitad de los nuevos casos detectados son bacilíferos, es decir, altamente contagiosos, la población continúa expuesta a la infección, y todos los años se genera un número variable de nuevos infectados que podrían constituirse en casos en el futuro.

Nuestro país presenta una situación intermedia entre los países de la región. En 2004 y 2005 se registraron 12.079 y 11.242 casos nuevos de tuberculosis, respectivamente. Si bien la tendencia continúa siendo descendente, la proporción de enfermos que abandonan el tratamiento sigue siendo alta.

El índice de Morbilidad (número de personas enfermas) fue 29,1/100000 en 2005 (6 veces más que América del Norte y la mitad que el Caribe Latino y la Región Andina). El índice de Mortalidad fue 2,2/100.000 en 2003, registrándose entre 800 y 900 defunciones atribuidas a tuberculosis, de las cuales el 82,8% están clasificadas como muertes debidas sólo a esta enfermedad y el 17,2% tiene asociación con SIDA o infección por VIH. En particular, entre 2003 y 2004 se registraron 30 defunciones debidas a meningitis tuberculosa o sus secuelas (INER 2006).

Patogenia

El bacilo de la tuberculosis se transmite por vía aerógena y es transportado dentro de gotas microscópicas de aerosol producidas por la tos o el estornudo de un paciente contagioso. Una vez inhalado, *M. tuberculosis* alcanza el pulmón. Allí es fagocitado por macrófagos alveolares donde puede ya sea morir o bien, si resiste el medio adverso que le proporciona el interior del fagosoma, multiplicarse y producir la infección. Si logra sobrevivir, al cabo de 2 ó 3 semanas provoca la destrucción de los macrófagos alveolares liberando al medio extracelular factores quimiotácticos que reclutan

monocitos, linfocitos y neutrófilos circulantes, ninguno de los cuales es capaz de eliminar por completo los bacilos. Así se forma un granuloma compuesto por células epitelioides, macrófagos y linfocitos, que evita la diseminación de los bacilos. El progreso de la infección o su entrada en latencia dependen principalmente del estado inmunológico del paciente y de la cantidad de bacilos presentes (Fenton 1996).

La gran resistencia de esta bacteria a las condiciones adversas está determinada no sólo por su gruesa pared celular sino también por su capacidad de adaptarse a cambios en el medio ambiente, para lo cual tiene la habilidad de modificar su metabolismo que, de aerobio pasa a ser microaerófilico, utilizando lípidos como fuente de carbono en lugar de hidratos de carbono. De esta forma puede sobrevivir en diversas condiciones en el huésped humano pasando de una alta tensión de oxígeno como la que hay el alvéolo pulmonar a la baja tensión presente en el granuloma (Barrera 2007).

Características de *M. tuberculosis*

M. tuberculosis se clasifica dentro del orden *Actinomycetales*, caracterizado tanto por el alto porcentaje de guanina y citosina que presenta en su ADN como por el alto contenido lipídico en su pared celular. Pertenecce a la familia *Mycobacteriaceae*, cuyo único género es *Mycobacterium* (ver Figura 1). Los lípidos constituyen la mitad del peso seco de estas bacterias, le proporcionan energía para llevar a cabo su metabolismo y también están involucrados en la estructura y en la función de las membranas y las organelas membranosas.

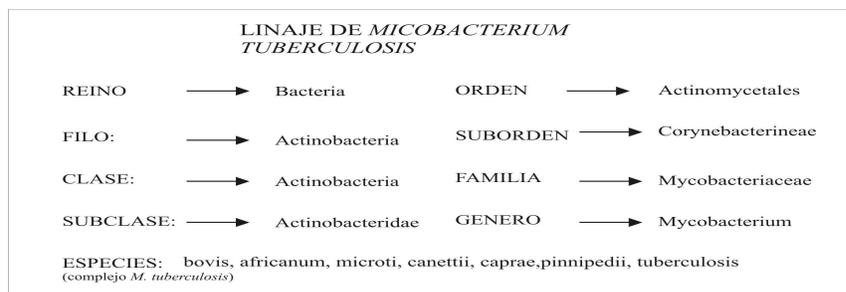


Figura 1. Clasificación de *Mycobacterium tuberculosis*

Son microorganismos prototróficos que significa que construyen sus componentes a partir de fuentes de carbono y nitrógeno, y heterotróficos porque utilizan compuestos orgánicos sintetizados como fuente de energía. Entre sus principales requerimientos nutricionales se encuentran el oxígeno, magnesio y hierro.

Las distintas especies de micobacterias se diferencian en varios aspectos tales como la morfología, la bioquímica, los hospedadores y la patología que producen. Así encontramos en el género tanto organismos de vida libre, los que rara vez producen enfermedad, como organismos de vida intracelular obligada (*Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepraemurium*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y los miembros del Complejo *M. tuberculosis*) que producen distintas patologías en diversos hospedadores. Entre las especies de vida intracelular, los miembros del complejo *M. tuberculosis* son capaces de reproducirse en medios artificiales de cultivo (*in vitro*), a

diferencia de *M. leprae* y *lepraemurium* que sólo pueden reproducirse en el medio intracelular (Barrera 2007).

Las micobacterias son bacilos inmóviles de 1-10 µm de largo, no esporulados y ácido-alcohol resistentes. Pueden ser clasificadas según el tiempo que demoran en crecer *in vitro*. Aquellas que lo hacen en menos de 7 días se denominan “de crecimiento rápido” y corresponden a especies de vida libre. Por otro lado, las micobacterias que demoran más de 7 días en formar colonias visibles se denominan “de crecimientos lento” y suelen ser patógenos intracelulares. Entre estas últimas se encuentra *M. tuberculosis*, que demora 4 a 6 semanas en formar colonias visibles. Con algunas excepciones, las micobacterias de crecimiento rápido tienen dos operones de ARN en su genoma mientras que las de crecimiento lento sólo tienen uno, lo que contribuiría a explicar la diferencia en el tiempo de desarrollo (Rastogi 2007).

Todas las micobacterias se caracterizan por presentar una gruesa y compleja pared celular (ver Figura 2). Por dentro de la misma se encuentra la membrana citoplasmática, típicamente compuesta por una clásica bicapa lipoproteica, la que regula el pasaje de solutos entre el citoplasma y el medio ambiente. Contigua a la membrana celular, se encuentra la capa más interna de la pared, la que está compuesta por una compacta trama de peptidoglicano, sustancia de gran rigidez que es responsable de preservar la forma y la integridad del bacilo. Por fuera del peptidoglicano y unido covalentemente al mismo está el arabinogalactano, polisacárido ramificado compuesto de arabinosa y galactosa. A su vez, los ácidos micólicos se encuentran unidos a la porción distal del arabinogalactano. Otros grupos importantes que forman parte de la pared celular son la trealosa y el lipoarabinomannan (LAM). Este último componente se encuentra unido a la membrana plasmática, atraviesa toda la pared celular y está constituido por una mezcla heterogénea de manosa y arabinosa unidas a lipopolisacáridos de alto peso molecular. Este componente es específico de cada especie y está involucrado en la unión de la bacteria al macrófago y también se le atribuye una acción parácrina atrayendo leucocitos durante la formación del granuloma (Fenton 1996).

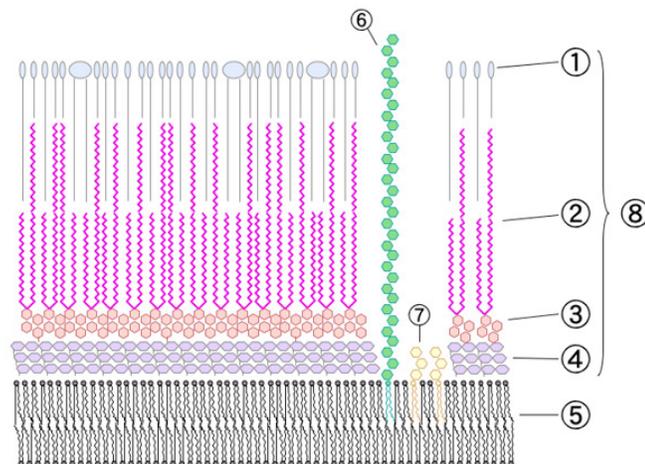


Figura 2. Representación esquemática de la pared celular de las micobacterias. 1 lípidos externos; 2 ácido micólico; 3 polisacáridos (arabinogalactano); 4 peptidoglicano; 5 membrana plasmática; 6 lipoarabinomannan (LAM); 7 fosfatidilinositol manósido; 8 esqueleto de la pared celular.

(Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Imagen:Mycobacterial_cell_wall_diagram.png)

Los ácidos micólicos de la pared bacteriana merecen atención especial. Son ácidos grasos de cadena larga y ramificada que también están representados en otros géneros relacionados. Como se observa en la [Tabla 1](#), los más largos corresponden al género *Mycobacterium*. A su vez, cada especie del género *Mycobacterium* contiene una combinación diferente de ácidos micólicos, lo que hace posible la identificación de muchas especies de micobacterias mediante cromatografía gaseosa o líquida.

Esta compleja pared celular confiere a las micobacterias ciertas particularidades:

- Resistencia a ácido-alcohol: esta característica permite diferenciarlas de las otras bacterias que no resisten este tipo de decoloración. Primero deben colorearse mediante un colorante básico como la fucsina unido a fenol que facilita la entrada a través de la gruesa pared de las micobacterias. Luego se las somete a decoloración mediante ácido-alcohol y por último se aplica un colorante secundario que puede ser azul de metileno. Prácticamente sólo las micobacterias resisten la decoloración permaneciendo unidas al primer colorante utilizado. Las técnicas pueden ser Ziehl-Neelsen, Kinyoun o tinción con fluorocromo, siendo la primera la más utilizada.
- Impermeabilidad: las micobacterias no pueden ser coloreadas con las técnicas habitualmente utilizadas para otras bacterias como la coloración de Gram, ya que su pared celular impide la entrada de los colorantes. En todo caso, su estructura se asemeja más a la de una bacteria Gram positiva. También son impermeables a ciertos antibióticos que son bactericidas efectivos para otras especies.
- Viabilidad prolongada: Los bacilos pueden permanecer viables en equipos o soluciones de trabajo contaminados durante períodos prolongados y también en material biológico sometido a fijación por calor o formol ([Kantor 1999](#), [Ramos 1999](#), [Ruddy 2002](#)).

Tabla 1: Géneros que contiene ácidos micólicos en su pared

Género	Largo de cadena (átomos de carbono)
<i>Corynebacterium</i>	22-38
<i>Rhodococcus</i>	34-52
<i>Nocardia</i>	44-60
<i>Gordonia</i>	48-66
<i>Tsukamurella</i>	67-78
<i>Mycobacterium</i>	60-90

Tradicionalmente se reconocían sólo cuatro miembros en el complejo *M. tuberculosis*. El hombre es el huésped habitual de dos de ellos: *M. tuberculosis* y *M. africanum*. Los otros dos, *M. bovis* y *M. microti*, tienen como huéspedes habituales a bóvidos y roedores, respectivamente. Recientemente se han propuesto tres nuevas especies: *M. canettii*, una especie patógena para el hombre aparentemente de menor virulencia, *M. caprae* que infecta principalmente a cabras y *M. pinnipedii* causante de tuberculosis en mamíferos marinos ([Cataldi 2007](#)).

La cepa de laboratorio *M. tuberculosis* H37Rv, cuyo genoma completo fue publicado en 1998, tiene una secuencia de $4,4 \times 10^6$ pares de bases. Se caracteriza por ser rico en segmentos repetitivos de ADN, particularmente en secuencias de inserción (IS) y grandes familias de genes. Estas secuencias repetitivas proporcionan cierto grado de polimorfismo al ADN cromosomal de *M. tuberculosis*, el que, por lo demás, está altamente conservado. Como se explicó más arriba, el porcentaje de guanina y citosina es muy alto (65%) y se mantiene relativamente constante a lo largo del cromosoma. Hay regiones denominadas secuencias polimórficas ricas en guanina y citosina (*Polymorphic G+C Rich Sequences*, PGRS), pertenecientes a una familia particular de genes en la que este porcentaje es aún mayor (>80%). Se demostró recientemente que esta familia de genes da lugar a dos familias de proteínas con alto contenido en aminoácido glicina (Gly), denominadas PE (Pro-Glu) y PPE (Pro-Pro-Glu), según la región N-terminal, y cuyo polimorfismo se asocia a las variaciones antigénicas que presenta la bacteria. También se encuentran regiones con un porcentaje de estas bases menor a 50%. Se atribuye a estas regiones los genes de proteínas que necesitan aminoácidos hidrófobos (ej. proteínas transmembrana), los que están codificados por codones con bajo contenido de guanina y citosina (Cole 1998, del Portillo 2007).

Como se mencionó anteriormente, sólo se encuentra un operón en el genoma de esta bacteria, operon (*rrn*), ubicado a 1,5 Mpb del sitio de origen de replicación (*ori C* locus). La presencia de un único operón situado distante del origen de replicación fue postulado como factor que contribuye al lento crecimiento que presenta esta bacteria (del Portillo 2007).

En el extenso genoma de esta bacteria se encontraron regiones de diferencia denominadas RD (*regions of difference*). Estas regiones están presentes en algunas especies dentro del complejo y ausentes en otras. Por ejemplo la región RD1 está presente en la cepa *M. tuberculosis* y ausente en *M. bovis* BCG, lo que ha permitido el diseño de métodos tanto moleculares como inmunológicos para diferenciar infección de vacunación (del Portillo 2007).

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico bacteriológico definitivo de tuberculosis activa se realiza mediante el hallazgo del bacilo en la muestra clínica. El papel del laboratorio es esencial para confirmar esta enfermedad por lo que debe contar con personal altamente entrenado y una infraestructura que cumpla todas las necesarias condiciones de bioseguridad. El proceso comienza con la toma de la muestra y continúa en el laboratorio con una serie de laboriosos pasos que finalizan con la tipificación del microorganismo recuperado y la determinación de su sensibilidad a drogas (Alonso 2007).

Microscopía

La observación microscópica directa de la muestra es un paso muy importante del diagnóstico de tuberculosis. Si se detectan bacilos directamente en la muestra clínica se puede adelantar el diagnóstico varias semanas, teniendo en cuenta que *M. tuberculosis* es una bacteria de crecimiento lento. Por lo tanto, el primer paso es la coloración de un frotis de la muestra, generalmente esputo, mediante la técnica de Ziehl-Neelsen. No siempre es posible encontrar bacilos. Para visualizarlos mediante coloración se requiere

una gran cantidad de ellos en la muestra, la que ha sido estimada entre 5.000 y 10.000 bacilos / ml de esputo.

Mediante la técnica de Ziehl-Neelsen los bacilos se ven pequeños y de color rojo. La microscopía no permite diferenciar entre las distintas especies de micobacterias. Sin embargo, la formación de cuerdas es altamente sugestiva de la presencia de *M. tuberculosis* (de Waard 2007).

Cultivo

Decontaminación

Las muestras clínicas que, como el esputo, provienen de sitios no estériles deben ser sometidas a un proceso de decontaminación con el objeto de evitar el crecimiento de la flora normal o de otros patógenos que, al desarrollar con mucha mayor rapidez, impedirían u ocultarían el desarrollo de *M. tuberculosis*. Otro objetivo de este procedimiento es degradar el mucus de la muestra para homogeneizarla y exponer los bacilos secuestrados en su seno. Algunos protocolos de decontaminación se completan con un paso de centrifugación para concentrar los bacilos. No existe un método ideal, lo conveniente es que cada laboratorio adopte el método más adecuado a sus condiciones de trabajo.

Los métodos de decontaminación más utilizados son:

- *Hidróxido de Sodio*: utiliza este reactivo en concentraciones entre 2 y 4 % para digerir y decontaminar a la vez. La concentración de hidróxido debe ajustarse empíricamente entre esos límites de tal modo de eliminar la flora normal sin comprometer la viabilidad de los bacilos. Este procedimiento incluye un paso posterior de neutralización del pH y otro final de centrifugación previa al cultivo.

- *N-acetil cisteína-Hidróxido de Sodio, Cloruro de sodio, Hidróxido de Sodio*: Estos métodos complementan el hidróxido de sodio con otra sustancia a fin de digerir el moco y/o reducir la concentración de hidróxido. El que incluye N-acetyl cisteína es uno de los métodos más utilizados en el mundo por su bajo costo y buenos resultados.

- *Acido oxálico*: es recomendado para decontaminar muestras en las cuales los contaminantes habituales son *Pseudomonas*, como por ejemplo muestras de pacientes con enfermedad fibroquística pulmonar.

- *Ogawa-Kudoh*: es un método rápido que combina decontaminación y cultivo y tanto la toma de muestra como la siembra en el medio de cultivo pueden ser realizadas directamente en adonde no hay acceso a facilidades de laboratorio, incluso en el domicilio del paciente. Consiste en la inmersión breve de un hisopado de la muestra en hidróxido de sodio y su inmediata siembra en el medio de cultivo Ogawa modificado. Este medio es una versión acidificada del clásico medio de Löwenstein-Jensen. De ese modo, la acidez del medio compensa la alcalinidad de la muestra y el procedimiento no requiere neutralización del hidróxido de sodio ni centrifugación.

- *Cetil piridinium y Cloruro de sodio*: se utiliza para decontaminar las muestras durante su traslado al laboratorio. Las micobacterias pueden permanecer viables en este medio de transporte durante más de 8 días.

Métodos de cultivo

Una vez decontaminadas, las muestras se siembran en medios de cultivos sólidos o líquidos. Los medios sólidos pueden ser a base de huevo o agar. Los medios de Lowenstein-Jensen y Ogawa se preparan a base de huevo e incluyen el colorante verde de malaquita que inhibe el crecimiento de microorganismos contaminantes. Los medios de Middlebrook 7H10 o 7H11 a base de agar contienen sales y están enriquecidos con ácido oleico, albúmina y dextrosa. Si se necesita un medio de cultivo más selectivo se puede agregar antimicrobianos como penicilina, ácido nalidíxico, carbenicilina, entre otros. Los medios líquidos como el Middlebrook 7H9 se emplean enriquecidos con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC).

Una vez inoculada la muestra, los cultivos en medio sólido se observan diariamente durante las primeras 4 semanas para detectar crecimiento. En el caso de *M. tuberculosis*, se observarán colonias no pigmentadas tanto si se lo incuba en oscuridad o si se lo expone a la luz (micobacteria no fotocromógena). Las colonias se observarán rugosas y de aspecto seco. El tiempo promedio que se tarda en detectar crecimiento por estos medios es 25 días. La demora hasta la aparición de colonias visibles es menor en medios a base de agar que en medios a base de huevo. En cultivo en medio líquido el desarrollo es aún más precoz y se detecta por turbidez (de Waard 2007).

Actualmente en muchos laboratorios del mundo se utilizan sistemas automatizados para cultivo de *M. tuberculosis*. Estos sistemas utilizan medio de cultivo líquido (Middlebrook 7H9) muy enriquecido con el agregado de una serie de antibióticos que inhiben el crecimiento de algunos contaminantes.

El sistema BACTEC 460 (Becton Dickinson, Sparks, MD) fue el primero, y durante décadas el único sistema semiautomático para la detección de micobacterias. Utiliza el medio Middlebrook 7H9 en el cual uno de los nutrientes, el ácido palmítico, se encuentra marcado radioactivamente con ^{14}C . El medio es enriquecido con OADC. Para controlar la contaminación se agrega una mezcla de cinco antibióticos (PANTA: polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima y azlocilina). La inoculación de las muestras se realiza mediante jeringa y aguja perforando las tapas de goma de los frascos de cultivo. La lectura del desarrollo se realiza en forma automática mediante una aguja que aspira la fase gaseosa de los sucesivos frascos inoculados. Un incinerador esteriliza la aguja entre frasco y frasco. Si hay crecimiento bacteriano se libera CO_2 (producto del metabolismo del palmitato) marcado que es analizado mediante un contador de radiación β . La incubadora y el contador de radiación son diferentes aparatos y los frascos deben ser trasladados manualmente para la lectura. La lectura se realiza dos veces a la semana los primeros 15 días y luego una vez a la semana. Este sistema se puede aplicar a cultivos de sangre, utilizando frascos especiales. El tiempo promedio en detectar crecimiento es de 15 días.

Los modernos sistemas totalmente automatizados como BACTEC 960 y BacT/Alert 3 D (antes denominado MB/BacT) combinan la incubación y la detección en el mismo aparato. Al igual que BACTEC 460, emplean el medio Middlebrook 7H9 suplementado en el momento de su uso con enriquecimiento OADC y una mezcla de antibióticos. Estos sistemas difieren entre sí en el sistema de detección del desarrollo bacteriano. En BACTEC 960, los tubos están provistos en su fondo con una lámina de siliconas embebida en una sal de rutenio que servirá como indicador fluorescente. Al crecer, la bacteria consume O_2 , el que evitaba la aparición de fluorescencia en ausencia de desarrollo. Este sistema no puede utilizarse para cultivos de sangre y el tiempo

promedio hasta la detección de crecimiento es de 15 días. Existe una versión manual de este sistema (MGIT) en la que los tubos son leídos individualmente bajo luz UV. En el sistema BacT/Alert 3 D las botellas tienen un sensor de CO₂ en el fondo y se les inocula la muestra con jeringa y aguja a través de un tapón de goma. Si hay crecimiento, el CO₂ producido por el metabolismo bacteriano causa un cambio de color en el sensor que pasa de verde a amarillo alterando la intensidad de la luz reflejada. Este sistema incluye botellas especiales para cultivos de sangre.

Los sistemas de cultivo automatizados emiten una señal sonora y/o luminosa apenas detectan crecimiento. En todos los casos el desarrollo de micobacterias debe ser confirmado mediante coloración e identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes.

Recientemente se ha propuesto el uso de técnicas caseras de bajo costo y baja complejidad para adelantar el diagnóstico. La detección temprana de microcolonias e identificación presuntiva de *M. tuberculosis* se realiza en la observación de colonias con morfología característica bajo lupa o microscopio de luz invertida, ya sea en cultivo en capa delgada de agar en cajas de Petri o en cultivos en medio líquido en placas de microtitulación (Tortoli 1999, Tortoli 2007).

Identificación fenotípica de *M. tuberculosis*

Velocidad de crecimiento, características morfológicas y bioquímicas

La identificación fenotípica de especie se basa en características tales como la velocidad de crecimiento, la morfología de las colonias, la pigmentación y las pruebas bioquímicas. *M. tuberculosis* se identifica por la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes de crecimiento lento, producción de colonias no pigmentadas. Entre las pruebas bioquímicas útiles para la identificación de esta especie se encuentran: la detección de niacina que se acumula en el medio de cultivo, actividad nitrataasa capaz de reducir nitratos a nitritos, la termolabilidad de la enzima catalasa que pierde actividad a temperatura de 68° C, enzima ureasa capaz de producir amoniaco a partir de urea y utilizar esta última como fuente de nitrógeno. Las pruebas adicionales que confirman un aislamiento como perteneciente a la especie *M. tuberculosis* son la susceptibilidad a pirazinamida, el crecimiento en presencia de la hidracida del ácido thiofenocarboxílico y la inhibición por el ácido p-nitrobenzoico (de Waard 2007).

Análisis de ácidos micólicos

Como se mencionó anteriormente, siete tipos de ácidos micólicos que se diferencian en la presencia de distintos grupos funcionales sirven para identificar especies dentro del género *Mycobacterium*. Esos tipos son: alfa-, alfa'-, metoxi-, ceto-, epoxi, ésteres de cera, y omega' metoxi-micolatos. Así es como cada especie contiene una combinación diferente de ácidos micólicos, lo que hace posible la identificación de muchas de ellas mediante cromatografía gaseosa o líquida. Una vez realizada su extracción, los lípidos son sometidos a análisis mediante cromatografía líquido-gas, de capa delgada o líquida de alta performance (HPLC). Estos sistemas logran la separación física de los lípidos arrastrados por un fluido (fase móvil) a medida que atraviesan un sólido (fase estacionaria). Los ácidos alfa, ceto y metilmicólico son específicos de *M. tuberculosis* y contienen cadenas de 76-82, 84-89 y 83-90 carbonos, respectivamente.

Identificación genotípica

La actual eclosión de las técnicas moleculares está permitiendo un mejor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad, de los factores de virulencia y de los mecanismos de resistencia. Diversos marcadores genéticos se utilizan para la identificación del complejo *M. tuberculosis*, algunos de los cuales permiten diferenciar entre especies dentro del complejo. Las secuencias elegidas pueden ser altamente conservadas o variables entre los miembros del género, complejo o especie, según lo que se pretenda identificar. Las secuencias de ADN más utilizadas para diferenciar entre especies son las siguientes: regiones hipervariables de los genes del ARN ribosomal **16S**, **23S** y la secuencia entre ambos que se denomina región **ITS** (*internal transcribed spacer*), el gen ***hsp65*** que codifica para una proteína de stress de 65 kDa (*heat-shock protein*), el gen ***rpoB*** que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa; el gen ***recA*** involucrado en la reparación del ADN, el gen ***sodA*** que codifica la enzima superóxido dismutasa y los genes ***gyrA*** y ***gyrB*** que codifican para las subunidades A y B de la enzima ADN girasa, respectivamente (Tortoli 2007).

Una secuencia característica de *M. tuberculosis* es la secuencia de inserción 6110 (IS6110). Esta secuencia, que pertenece a la familia IS3, es utilizada para identificación de especies. En el genoma de *M. tuberculosis H37Rv*, cepa de referencia de la cual se conoce el genoma completo, se encontraron 16 copias de esta secuencia de inserción.

Las regiones de diferenciación RD, mencionadas anteriormente son otras de las regiones útiles para diferenciar especies dentro del complejo *M. tuberculosis* (del Portillo 2007).

Detección directa en muestras clínicas mediante amplificación de ADN

La aparición de métodos basados en la amplificación del ADN tales como PCR (*polymerase chain reaction*) generó grandes expectativas en el diagnóstico directo de tuberculosis directamente a partir de la muestra clínica. Estos métodos parecían ser muy prometedores debido a su altísima sensibilidad, rapidez y la relativamente baja complejidad de su ejecución. Sin embargo, en el transcurso del tiempo, demostraron poseer una sensibilidad real mucho menor que la sensibilidad teórica, lo que se traduce en el alto número de falsos negativos debidos a diversas causas como falla en la extracción de ADN, presencia de inhibidores en la muestra, muestras paubacilares etc. Otra desventaja que presentan es la frecuente contaminación de los reactivos y el ambiente con productos amplificados previamente lo que concluye en la obtención de resultados falsos positivos. Se apeló a diversos recursos con el objetivo de lograr una mayor sensibilidad y/o evitar la contaminación por amplicones, como la inclusión de controles internos, doble amplificación (*nested PCR*), amplificación de ARN en lugar de ADN, el empleo de dUTPs/uracil glicosilasa, etc. En el diagnóstico de tuberculosis su utilidad es muy restringida debido al elevado costo de los kits comerciales y la falta de estandarización de los métodos caseros. De hecho estas técnicas por ahora se aplican preferentemente en países industrializados y bajo ciertas condiciones. En nuestro país su uso está restringido a laboratorios de referencia o investigación.

Algunos equipos comerciales son:

- *Amplicor MTB Test* (Roche Molecular Systems, Basel, Switzerland): Se basa en la amplificación de la secuencia del gen que codifica el ARN ribosomal 16S presente en el género. En un paso posterior el producto amplificado es hibridado con sondas

complementarias a secuencias específicas del complejo *M. tuberculosis*. Entre los nucleótidos agregados para llevar a cabo la amplificación se encuentra uracilo en lugar de timidina. Antes de la amplificación se agrega la enzima uracil- N- glicosilasa que destruye cualquier producto de amplificaciones anteriores, evitando de este modo la aparición de falsos positivos. Utiliza cebadores biotinilados y la detección se realiza mediante el agregado del conjugado enzima-avidina y el sustrato cromogénico. Incluye un control interno que consiste en un ADN sintético donde se pegan los cebadores igual que en el ADN en estudio. De esta forma si el control interno no amplifica, se estaría en presencia de un inhibidor. Este método está aprobado por la US FDA (*Food and Drug Administration*). Según trabajos publicados la especificidad de este método es de 100% mientras que la sensibilidad varía de 90% a 100% en muestras con examen directo positivo y de 50% a 96% en muestras con examen directo negativo.

- *Prueba Directa de Amplificación de M. tuberculosis (Amplified MTD)* GenProbe (San Diego, CA, USA): Se basa en la amplificación del ADN sintetizado a partir de la región 16S del ARN ribosómico mediante transcriptasa reversa (TR). También se utiliza una ribonucleasa que degrada el ARN una vez que se produjo la transcripción reversa. La detección de los productos amplificados se realiza mediante hibridación con una sonda de ADN marcada con una molécula quimioluminiscente. El uso de ARN ribosómico en lugar de ADN como templado tiene tres grandes ventajas: i) *M. tuberculosis* posee múltiples copias (aprox. 2000) del ARN ribosómico mientras que su cromosoma tiene una sola copia de el gen correspondiente (mayor sensibilidad); ii) se evita la aparición de falsos positivos producidos por contaminaciones con amplicones; iii) no requiere el uso de termociclador ya que el proceso de amplificación se lleva a cabo a 42 °C. En una segunda etapa, los productos amplificados son hibridados con una sonda complementaria a secuencias específicas de especie marcada con una molécula quimioluminiscente. Esto aumenta la especificidad de la técnica. El tiempo necesario es de 2,5 horas. Esta técnica no tiene control interno por lo que no puede evidenciarse la presencia de algún inhibidor en la muestra.

Identificación de especie mediante métodos moleculares

Se describe a continuación algunos métodos para la identificación genotípica de especie y subespecie:

- *PRA (PCR Restriction-Enzyme Analysis)*: Este método casero consiste en la amplificación de un segmento del gen *hsp65* (heat-shock protein) mediante PCR con cebadores específicos para esta región. El producto amplificado es digerido con dos enzimas de restricción: *BstEII* y *HaeIII* y los fragmentos resultantes son separados mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida. Los perfiles obtenidos pueden ser comparados con los existentes en la base de datos denominada PRASite disponible en Internet. Esta base ha sido recientemente actualizada y contiene 174 patrones correspondientes a 119 especies de micobacterias (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>). En nuestro laboratorio de referencia la técnica PRA fue evaluada dentro del contexto de un proyecto multicéntrico de la Unión Europea con muy buenos resultados. Como además tiene bajo costo y está estandarizado, el PRA es un excelente sustituto de los métodos comerciales para la identificación de micobacterias en los países de recursos limitados. También se obtienen buenos resultados aplicando esta misma técnica a otros marcadores genéticos como *rpoB* and *gyrB* (Leao 2005).

- *Sondas de ADN en medio líquido (Sistema Accuprobe)*: Se trata de oligonucleótidos complementarios a determinadas secuencias específicas de cada especie que se encuentran en la porción hipervariable del segmento 16S del ARN ribosómico. Dichos oligonucleótidos están marcados con una molécula quimioluminiscente y emiten luz cuando son excitados. Cada complejo o especie requiere el uso de una sonda específica y todas las reacciones ocurren en medio líquido. Se trata de un método muy preciso, rápido y sencillo que no requiere amplificación. Sin embargo, sólo laboratorios con amplios recursos pueden sostenerlo en la rutina debido a su alto costo.

- *Hibridación en fase sólida (line probe assays)*: El ADN investigado es amplificado con cebadores marcados con biotina y luego sometido a hibridación reversa con sondas específicas de especie previamente inmovilizadas en tiras de papel y ubicadas en línea. Después de la hibridación el resultado se visualiza mediante el agregado de conjugado estreptoavidina-enzima, y un sustrato cromogénico. Existen diversos sistemas comerciales:

INNO LiPA Mycobacteria: las sondas que utiliza este método son específicas para la secuencia del cromosoma que codifica región ITS ubicada entre las regiones 16S y 23S del ribosoma. Incluye sondas para identificar el género *Mycobacterium*, los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium*, 18 especies y algunas subespecies.

GenoType Mycobacterium: utiliza como marcador genético la región 23S de ARN ribosomal, una combinación de distintas bandas caracteriza 35 especies diferentes.

GenoType MTBC: este método investiga varias regiones genéticas a la vez, mediante una PCR multiplex (utiliza varios cebadores a la vez). Once sondas están presentes en la tira de papel: una complementaria a la región 23S ribosomal de ADN, nueve al gen *gyrB* y uno a la región que flanquea al segmento RD1 (regions of difference) (región de diferencia específica de *M. bovis BCG*). El gen 23S ribosomal se utiliza para confirmar que se trata del complejo *M. tuberculosis*. Las demás sondas permiten diferenciar entre las especies del complejo, incluida *M. bovis BCG*.

Secuenciación

Para identificación genética es necesario elegir una secuencia que se presente altamente conservada pero que a la vez tenga segmentos variables que nos permita una diferenciación entre especies. El más utilizado para este fin es el gen 16S ribosomal ya que presenta regiones altamente conservadas compartidas por casi todos los organismos vivos, regiones específicas de género, y otras hipervariables que le dan la especificidad a las especies. Las secuencias variables entre especies se encuentran en el primer tercio de este gen de 1500 pares de bases, por lo que secuenciando los primeros 500 pares de bases se puede diferenciar todas las especies dentro de este género. Es importante secuenciar las dos cadenas complementarias (con ambos cebadores 3' y 5') para resolver discrepancias. El perfil obtenido es comparado en una base de datos con un perfil conocido. Hay varias bases de datos disponibles en Internet: [GenBank](#), [EMBL](#), [DDBJ](#), y existe también una base destinada exclusivamente a las secuencias 16S e ITS de ADN ribosomal ([Tortoli 2007](#)).

Detección de resistencia a drogas

A diferencia de la mayoría de las bacterias en las cuales la resistencia se adquiere a través de plásmidos o transposones, en *M. tuberculosis* la resistencia se genera por

mutaciones en el ADN cromosómico. La gruesa pared celular que presentan los miembros de esta familia es la primera barrera en impedir la llegada de algunas drogas a su sitio de acción, otros determinantes de resistencia como enzimas (β -lactamasas, aminoglucosidasas, acetiltransferasas) y bombas de eflujo se encuentran igualmente codificados en el cromosoma (Cole 1998).

Existen drogas antituberculosis de primera y segunda línea. Las de primera línea son: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), ethambutol (ETH), estreptomycin (SM) y pirazinamida (PZA). Las de segunda línea son: aminoglucósidos como kanamicina y amikacina, el polipéptido capreomicina, ácido para-aminosalicílico, cicloserina, tionamidas y fluoroquinonas como levofloxacin, gatifloxacin y moxifloxacin. En algunos lugares ubican a SM como droga de segunda línea debido a que su utilización decayó mucho. Históricamente, fue el primer antibiótico empleado para el tratamiento de tuberculosis y las cepas de *M. tuberculosis* circulando actualmente en el mundo todavía presentan altos niveles de resistencia. Por otra parte, aparecieron nuevos antibióticos con mayor efectividad. Así, derivados de la rifamicina podrían eventualmente incluirse entre las drogas de la primera línea, y seguramente en un futuro se incluirán también las nuevas fluoroquinonas.

La multiresistencia a drogas anti-tuberculosas es definida por la OMS como la resistencia al menos a INH y RIF. En la actualidad, es alarmante la aparición de cepas multiresistentes, sobre todo en pacientes HIV positivos o en aquellos en los que hubo falla o abandono de tratamiento. El problema de la multiresistencia se complicó aún más con la aparición de cepas con resistencia extendida (XDR) que consiste en resistencia a INH y RIF con el agregado de resistencia a drogas clave de segunda línea, incluida la resistencia a una de las fluoroquinonas y a una de las drogas antituberculosas inyectables (amino glucósidos y capreomicina). Los pacientes que son afectados con cepas multiresistentes y, sobre todo con resistencia extendida, tienen una baja probabilidad de sobrevivir ya que la terapia con drogas de segunda línea es menos efectiva, más tóxica y 100 veces más costosa que el tratamiento de primera línea (Martin 2007, Palmero 2007, Ritacco 1997).

Por definición, la sensibilidad de *M. tuberculosis* a drogas se determina fenotípicamente en base a la inhibición de crecimiento de la bacteria en presencia de un antibiótico en comparación con el crecimiento de la misma bacteria en ausencia del antibiótico o el de una cepa sensible de referencia. Los recientes métodos genotípicos de detección de resistencia son siempre indirectos y se basan en la identificación de una mutación en un gen asociado con la resistencia investigada.

Pruebas fenotípicas de sensibilidad a drogas

Las pruebas de sensibilidad clásicas en medio sólido de cultivo son:

- *Método de las proporciones*: Es el método más generalizado en nuestro país. Permite la determinación de la proporción de mutantes resistentes a una determinada droga. Se parte de una suspensión bacteriana a la que se le realizan diluciones seriadas. Cada una de las diluciones se siembra por duplicado en un tubo con el antibiótico a estudiar y otro tubo sin antibiótico que es utilizado como control. Se elige una de las diluciones en las cuales el número de colonias pueda contarse. Se realiza el recuento de colonias en el tubo con antibiótico y en el tubo control y así se obtiene la proporción de colonias que crecieron en presencia del antibiótico en estudio. Si esta proporción es mayor a 1% para INH, RIF y ácido para-aminosalicílico, o 10% para las otras drogas, la cepa se considera

resistente. Si el medio utilizado es Löwenstein-Jensen, la primera lectura se realiza a los 28 días y si el medio es Middlebrook 7H10/11 a los 21 días (Martin 2007).

- *Método de cociente*: Consiste en preparar diluciones seriadas de un antibiótico y agregarlas al medio de cultivo sólido (un tubo para cada concentración de antibiótico). Luego se siembra en estos medios un inóculo estandarizado de la cepa en estudio y otro de una cepa control. Después de 4 semanas de la siembra, se observa el número de colonias presentes en cada tubo. Se considera crecimiento positivo cuando crecieron más de 20 colonias. La CIM (concentración inhibitoria mínima) corresponde a la mínima concentración de antibiótico que inhibió el crecimiento bacteriano. Los resultados se expresan como el cociente entre la CIM de un determinado antibiótico para el aislamiento en estudio y la del mismo antibiótico para la cepa de referencia H37Rv, cuyos rangos son conocidos.

- *Método de concentraciones absolutas*: Este método consiste en sembrar un inóculo estándar la cepa en estudio paralelamente con la cepa de referencia H37Rv en medios de cultivo sólido que contengan diluciones seriadas de antibiótico, y como control en medio sin antibiótico. Luego de 4 semanas se observa el crecimiento. La cepa se considera sensible si el desarrollo es menor a 20 colonias en el medio de cultivo con antibiótico, y con un crecimiento de +++ o ++++ en el medio libre de antibiótico. La resistencia se expresa en base a la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

Recientemente han aparecido otras pruebas que tienden a acortar el tiempo al diagnóstico:

- *Métodos automatizados*: La sensibilidad a drogas puede probarse también mediante sistemas automatizados en medio de cultivo líquido. El sistema BACTEC 460 como se mencionó anteriormente, mide la producción de CO₂ expresado diariamente como un índice de crecimiento. Se trabaja con la cepa problema y la de referencia H37Rv, utilizando como control un medio sin antibiótico. Si en el medio que contiene la droga el índice de crecimiento se detiene mientras que en el medio control sigue aumentando, se trata de una cepa sensible a dicho antibiótico. Si el sistema utilizado es MGIT que mide el consumo de O₂, la cepa sensible será aquella que en presencia de antibiótico no consume O₂ por lo tanto no produzca fluorescencia.

- *Métodos colorimétricos*: Estos métodos se basan en la utilización de un indicador redox que cambia de color cuando pasa de estado oxidado a estado reducido. Este cambio de color es directamente proporcional a la cantidad de bacterias viables en el medio de cultivo, por lo tanto la resistencia se expresa como cambio de color en el medio. El resultado se puede obtener dentro de 1-2 semanas. Los indicadores utilizados pueden ser: Alamar blue, resazurina, tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide or MTT. Estos métodos permiten una rápida determinación de resistencia con bajos costos.

- *Prueba de nitrato reductasa*: Esta técnica se basa en la capacidad que tiene *M. tuberculosis* de reducir el nitrato a nitrito, este último compuesto es detectado por un reactivo que se agrega al medio de cultivo. En presencia de antibiótico, la bacteria pierde viabilidad y por lo tanto también esta capacidad de reducir el nitrato. Las cepas resistentes al antibiótico estudiado mostrarán un color rojo a rosado en el medio de cultivo mientras que las cepas sensibles no mostrarán color. Esta reacción puede visualizarse a los 10 días de incubación.

- *Método de observación microscópica de medio de cultivo (MODS)*: Como se mencionó más arriba, se basa en la observación de las cuerdas características de *M. tuberculosis* mediante un microscopio de luz invertida. Si la cepa es resistente se observarán las cuerdas características en presencia del antibiótico a estudiar dentro de un promedio de 10 días. Este método fue calificado como específico, sensible, rápido y económico, pero el microscopio de luz invertida no es parte del equipo habitual de un laboratorio de micobacterias.

- *Método de microcolonias en capa delgada*: Igual que el anterior se basa en la observación de las micro colonias formadas en una capa delgada de agar 7H11 en presencia de antibiótico. Los resultados pueden obtenerse dentro de la semana.

Determinación genotípica de resistencia

- *Secuenciación de ADN*: Igual que para la identificación de especies, se trabaja con secuenciadores automáticos. Mediante este método se pueden identificar las mutaciones producidas en el ADN bacteriano, relacionadas con la resistencia a alguna droga. Las mutaciones más extensamente analizadas son las del gen *rpoB* asociadas a resistencia a RIF y las del gen *katG* asociadas a resistencia a INH.

- *Hibridación en fase sólida (LiPA)*: En este momento se encuentran disponibles dos métodos comerciales: INNO-LiPA Rif, que detecta resistencia a RIF, y GenoType MTBDR que detecta simultáneamente resistencia a INH y RIF.

El método LiPA se basa en la hibridación reversa de ADN amplificado con 10 sondas específicas para el gen *rpoB*, que cubren la secuencia salvaje y las mutaciones más frecuentes de dicho gen asociadas a resistencia. Las sondas están inmovilizadas en tiritas de nitrocelulosa. La presencia o ausencia de estas regiones se visualiza por una reacción de color que permite determinar si la cepa es sensible o resistente a las drogas. El ADN puede extraerse a partir de un cultivo o a partir de la muestra clínica obteniendo en ambos casos una alta sensibilidad y especificidad.

El método GenoType MTBDR detecta, como el anterior, mutaciones producidas en los genes de interés mediante hibridación reversa con sondas inmovilizadas en tiritas de nitrocelulosa. En este caso, además de mutaciones en el gen *rpoB* asociadas a resistencia a RIF se investiga la presencia de mutaciones en el gen *katG* para determinar resistencia a INH. Puede realizarse directamente de la muestra clínica (Martín 2007).

Ambos métodos son fáciles de realizar pero debe tenerse en cuenta que un porcentaje de cepas resistentes no presentan mutación asociada.

El *rifoligotyping* es un método de hibridación reversa de tipo casero para la detección de resistencia a RIF. Tiene el mismo principio que los anteriores y es menos costoso (Morcillo 2002).

PCR en tiempo real: Es un método introducido recientemente para la detección rápida de resistencia a drogas en cepas de *M. tuberculosis*. Se basa igual que todas las PCR en la amplificación del segmento de interés pero emplea cebadores especiales que van produciendo una señal a medida que transcurre la amplificación. De esta forma los resultados están en un lapso menor (1,5-2 horas desde la extracción) y no requiere la electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para la visualización del producto de la amplificación. Esto último, además de reducir el tiempo al diagnóstico, reduce el riesgo biológico que presenta este compuesto y también el riesgo de contaminación del ambiente con amplicones. Se obtienen los resultados con un índice

muy bajo de contaminaciones, pero la gran desventaja es que por los elevados costos de sus reactivos muy pocos laboratorios pueden utilizarlo por lo que se reserva a los laboratorios de referencia que, por otro lado, se encuentran capacitados para poner la técnica a punto y evaluar los resultados (Ruiz 2004).

Microarrays: Se basa en la hibridación del ADN obtenido a partir de una muestra clínica con sondas específicas para la mutación estudiada, inmovilizadas en una delgada lámina de vidrio. Se ha utilizado para la detección de INH y RIF. Recientemente se describió CombiChip Mycobacteria Drug-Resistance que combina la amplificación mediante PCR con la aplicación de sondas específicas para detectar mutaciones asociadas a la resistencia a RIF e INH (Martín 2007).

Antecedentes del problema a investigar

El diagnóstico bacteriológico incluye una serie de complejos pasos que van desde la obtención de la muestra clínica hasta la identificación de *M. tuberculosis*. Es probable que en alguno de estos pasos se produzca una contaminación cruzada por transferencia accidental de bacilos de una muestra altamente positiva a la o las procesadas subsecuentemente. La mayoría de las veces, este error que puede generar uno o más resultados falsos positivos pasa inadvertido en la rutina de trabajo de los laboratorios que cultivan micobacterias (Glyn 2004, Ritacco 2002).

La frecuencia con que ocurre este tipo de error es mayor de lo sospechado pero no resulta fácil comparar los porcentajes comunicados por los distintos laboratorios. Algunos autores refieren el número de falsos positivos al total de muestras procesadas en el laboratorio, otros al total de cultivos positivos, y otros al total de casos de tuberculosis diagnosticados. En ocasiones, la contaminación se confirma cuando se investiga un episodio sospechado, en otras es develada casualmente en el transcurso de un estudio epidemiológico. Según lo publicado, entre 0.33% y 16% de los cultivos positivos son falsos cultivos positivos debidos a este error, pero en la mayor parte de los casos el porcentaje ronda en 3% (Bhattacharya 1998, Burman 2000, Burman 1997, de Boer 2002, Fischl 1992, Glyn 2004, Gutierrez 1998, Martínez 2006, Moore 2006, Reniero 1999, Small 1993, Wurtz 1996, Yan 2005).

Causas de la contaminación cruzada

El error puede producirse en cualquiera de los pasos que conforman el procesamiento bacteriológico de una muestra clínica, desde la manipulación de la muestra fresca hasta las pruebas de identificación (Bauer 1997, van Duin 1998). No siempre es posible detectar la causa de una contaminación porque suelen pasar semanas desde el evento que la origina hasta el desarrollo de los cultivos contaminados, y aún más tiempo hasta la confirmación del error. En ese lapso, las circunstancias que favorecieron la contaminación pudieron haber cambiado y los instrumentos/reactivos involucrados haber sido reemplazados (Ritacco 2002, Small 1993).

Uno de los principales factores que contribuyen a la contaminación cruzada es la notable capacidad de *M. tuberculosis* de sobrevivir en condiciones adversas, como se mencionó anteriormente.

La contaminación de la muestra se puede producir aún antes de su llegada al laboratorio por causa de un instrumento. Por ejemplo, los bacilos de un paciente sometido a

broncoscopía pueden sobrevivir a la esterilización del equipo y desarrollar en la o las muestras de lavado broncoalveolar tomadas a continuación. Lo que es aún más grave, un broncoscopio contaminado puede transmitir la infección de un paciente a otro (Burman 2000, Ramos 1999).

Diversas circunstancias pueden aumentar el riesgo de contaminación en el laboratorio, entre ellas se encuentran:

- *Cantidad de muestras procesadas por año*: La probabilidad de estos accidentes es mayor cuando existe sobrecarga de trabajo y se procesan lotes de muchas muestras por jornada. Por otro lado, cuando se procesa un exiguo número de muestras por año también existe riesgo de contaminación por falta de práctica (Bauer 1997, Burman 1997, de Boer 2002, Ramos 1999, Ritacco 1999, Wurtz 1996).

- *Manejo de muestras en lote*: La complejidad técnica del cultivo de las micobacterias favorece sutiles errores de manipulación que suelen pasar inadvertidos. En este sentido, el paso más vulnerable es la decontaminación de la muestra. Como se explicó más arriba, los especímenes que provienen de sitios no estériles deben ser decontaminados con el objeto de evitar el crecimiento de microorganismos ambientales o de la flora normal de la muestra. Las soluciones usadas en este paso pueden, valga la redundancia, contaminarse con bacilos de una muestra con alta carga bacilar y albergar microorganismos viables durante períodos llamativamente prolongados. El roce inadvertido de bordes de recipientes de soluciones o pipetas con material contaminado, la formación de aerosoles al dispensar un reactivo sobre la muestra o al descartar suspensiones de bacilos en recipientes comunes pueden generar transferencia de esta bacteria de una muestra a otra (Burman 2000, Ramos 1999).

- *Empleo de medios líquidos de cultivos*: Se atribuye un riesgo mayor de falsos cultivos positivos al uso de medios líquidos. Estos medios muy enriquecidos ofrecen óptimas condiciones de crecimiento a bacilos transferidos, aún a partir de un inóculo muy pequeño y/o después de sufrir estrés en el transporte, en el ambiente del laboratorio o durante el procesamiento de la muestra. Asimismo, la manipulación de líquidos favorece la formación de aerosoles, lo que acrecienta el riesgo de contaminación cruzada. Además, las pipetas y, en particular, las micropipetas empleadas para dispensar las muestras pueden contaminarse y transferir bacilos (Tortoli 1999, Gascoyne-Binzi 2001). Recientemente se ha propuesto el cultivo en medio líquido en placas de microtitulación. Si bien es lógico pensar que estos micrométodos podrían favorecer la transferencia entre pocillos contiguos, esto no ha sido demostrado hasta el momento (Moore 2006).

Flujo laminar: muchos laboratorios de nuestro país cuentan con un solo flujo laminar destinado al trabajo con *M. tuberculosis*, de manera que deben procesarse en el mismo lugar los materiales clínicos y los cultivos. Algunos autores refieren a esta práctica como causa de contaminaciones. Otros proponen que una de las causas podría estar en procesar las muestras clínicas positivas al examen directo y luego las negativas el mismo día (Carroll 2002).

Detección radiométrica: El sistema de detección radiométrica BACTEC 460TB acrecienta el riesgo de contaminación cruzada. Para la inoculación de los frascos y la lectura del crecimiento este sistema toma una muestra de la atmósfera del frasco de cultivo utilizando una aguja que perfora uno tras otro los tapones de goma. Una sutil falla en el funcionamiento del incinerador que esteriliza la aguja entre muestra y

muestra puede traer como consecuencia el traslado de bacilos viables de un frasco de cultivo positivo a los siguientes (Ritacco 2002, Small 1993).

Entrenamiento del personal: La incorporación de nuevo personal al laboratorio, más aún si no tiene entrenamiento adecuado, puede también considerarse un factor de riesgo (Bauer 1997).

Testigos positivos: los cultivos de cepas de laboratorio usados asiduamente para este fin, pueden contaminar equipo, soluciones o material de trabajo y agregarse como factor de riesgo de contaminación cruzada de laboratorio (Fitzpatrick 2004).

Consecuencias

Debido al extenso período de tiempo que transcurre entre la sospecha de un evento de contaminación cruzada de muestras hasta su confirmación, la consecuencia más común es el inicio de un tratamiento antibiótico innecesario (Burman 2000, van Duin 1998, Small 1993). En Holanda se demostró que 31% de los pacientes con falso diagnóstico de tuberculosis recibieron tratamiento y 12% fueron hospitalizados (de Boer 2002). El tratamiento de la tuberculosis no es inocuo y puede ocasionar efectos adversos. Además el diagnóstico erróneo retrasa o impide el tratamiento de la verdadera etiología, a veces con consecuencias graves para el paciente (Bauer 1997, Gutierrez 1998).

La contaminación cruzada también tiene consecuencias socio-económicas. En primer lugar, un paciente sin tuberculosis puede sufrir discriminación laboral y marginación social en ambientes donde la enfermedad es un estigma. Por otra parte, este error genera un desvío de recursos tanto humanos como económicos, si se tiene en cuenta el costo laboral de personal de laboratorio y de atención médica, de materiales consumidos por el laboratorio, y de antibióticos, en caso de ser utilizados (de Boer 2002).

Por último, si pasan inadvertidos, los eventos de contaminación falsean los resultados de estudios epidemiológicos tanto convencionales como moleculares, sobreestimando las tasas de incidencia y de transmisión de tuberculosis (Burman 2000, de Boer 2002). Se han descrito extensos episodios de contaminación sometidos a genotipificación que habían sido interpretados erróneamente como brotes de tuberculosis (Cronin 1998, Segal-Maurer 1998). Algunos de esos pseudo-brotes fueron ocasionados por cepas multiresistentes y los pacientes con falso diagnóstico fueron gratuitamente sometidos a tratamiento con drogas de segunda línea, que son de mayor costo, más difícil acceso y más efectos adversos que las que integran el tratamiento estándar (Bearman 2002, Small 1993).

Criterios para la confirmación

La sospecha de contaminación cruzada generalmente comienza en el laboratorio cuando aparecen cultivos positivos con escaso desarrollo a partir de una o varias muestras con negativas al examen microscópico directo (baciloscopia) procesadas dentro de la misma semana que una muestra con alta carga bacilar, por el mismo operador, en la misma cabina de bioseguridad, y/o empleando los mismos lotes de reactivos (de Boer 2002, Glynn 2004). La obtención de una sola o muy pocas colonias ha sido identificada como señal de alarma de contaminación (Gutierrez 1998, Nivin 1998, Small 1993). Otras señales son el aumento repentino en la frecuencia de cultivos positivos en el laboratorio y la presunción clínica fuerte o confirmación diagnóstica de otra etiología en el momento del informe del cultivo positivo (Fitzpatrick 2004, Cronin 1998).

Estas señales son sólo el comienzo de una serie de pasos para la confirmación de la contaminación. El primer paso es la genotipificación de las cepas involucradas. Si los perfiles genéticos son idénticos, el proceso de confirmación sigue su curso. Si se dispone de otro aislamiento del paciente cuyo cultivo se presume contaminado, y su perfil genético es diferente al del episodio en cuestión, se sustenta la sospecha de contaminación. El perfil de resistencia a drogas anti-tuberculosis también puede contribuir a investigar el evento. La coincidencia tanto en el perfil genético como en el perfil de resistencia a drogas de los aislamientos bajo sospecha refuerza aún más la presunción de contaminación (Cronin 1998, Kremer 1999).

Una vez obtenidos todos los perfiles genéticos disponibles para esclarecer el presunto episodio de contaminación, es necesario recurrir a la información clínica de los pacientes involucrados. Se refuerza la sospecha cuando el cuadro clínico de los pacientes cuyas muestras se presumen contaminadas era inespecífico en el momento de la investigación diagnóstica, o, como se ha dicho, cuando la evolución posterior no resultó compatible con tuberculosis y, por supuesto, cuando en el ínterin se confirmó otra etiología (Small 1993).

Es importante evaluar los perfiles genéticos a la luz de la información epidemiológica. En áreas endémicas, la presencia de cultivos con idéntico perfil genético entre las muestras procesadas en un período breve de tiempo puede no ser suficiente para confirmar la contaminación. Esto se debe a que, en una población con alta incidencia y transmisión activa de la enfermedad, la diversidad genética de *M. tuberculosis* suele ser baja. Por otra parte, cabe considerar que distintos aislamientos de un mismo paciente pueden presentar genotipos desiguales en los casos de re-infección por una cepa diferente o de infección simultánea por más de una cepa (Braden 2001, Glynn 2004, Das 2004, van Rie 2005, Warren 2004).

Por último, es preciso resaltar que ciertos datos epidemiológicos pueden ayudar a descartar una sospecha fuerte de contaminación. El estudio de foco es crítico pues genotipos idénticos pueden evidenciar transmisión real entre contactos (Bearman 2002, Carroll 2003). Por lo tanto, cada caso presuntamente involucrado en un evento de contaminación cruzada deberá ser evaluado individualmente a la luz del conjunto de evidencias disponibles, clínicas, bacteriológicas, genotípicas y epidemiológicas (Gutierrez 1998, van Duin 1998).

Las bases moleculares de la genotipificación

Diversos métodos de exploración genotípica identifican segmentos repetitivos que varían en número de copias y posición dentro del cromosoma entre distintos individuos de una misma especie. Entre estos elementos repetitivos, las secuencias de inserción (ISs) son, en principio, candidatos ideales para genotipificación intraespecie. En efecto, estas secuencias repetitivas se duplican, se trasladan y se sitúan en diferentes sitios dentro del cromosoma del complejo *M. tuberculosis*. Como consecuencia de este proceso, la posición y el número de repeticiones varían entre cepa y cepa, generando de este modo perfiles genéticos diferentes que sirven para la tipificación intra-especie. Entre las ISs descritas en el complejo *M. tuberculosis*, la más utilizada es IS6110 porque es específica de miembros del complejo, en los que está presente en un rango de 0 a 20 copias. En particular, la especie *M. tuberculosis* contiene entre 8 y 20 copias, lo que otorga un óptimo poder de discriminación en pruebas de hibridación y restricción. En efecto, un número más bajo de copias resulta en un bajo poder de diferenciación y

un número más alto produce imágenes difíciles de interpretar por superposición de bandas (van Soolingen 1993).

Otros marcadores genotípicos son las *secuencias repetitivas cortas de ADN*, incluidas las PGRSs mencionadas más arriba y las secuencias repetidas en tandem que varían el número de esas repeticiones (*Variable Numbers of Tandem DNA Repeat*, VNTR). Se identificaron 11 loci VNTRs en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, 5 corresponden al *Major Polymorphic Tandem Repeat* (MPTR), presentes en múltiples loci dentro del cromosoma, y 6 a las *Exact Tandem Repeat* (ETR), 6 loci con secuencias idénticas en repeticiones adyacentes. Algunas de estas ETR se encuentran en regiones intergénicas. Según el tamaño de las secuencias que se repiten, los VNTRs se clasifican en microsatélites o short sequence repeats SSRs (1-13pb) y minisatélites (10-100 pb) (Kremer 1999).

Las *Direct Repeat* (DR) son repeticiones cortas (36pb) presentes en un solo locus dentro del cromosoma del complejo *M. tuberculosis* y separadas por una secuencia no repetitiva de 35 a 41 pb de longitud. Las cepas varían en la cantidad de repeticiones de DRs y en la presencia o ausencia de los espaciadores. En las cepas de *M. tuberculosis*, la secuencia DR se mantiene conservada por lo tanto el polimorfismo está dado por las secuencias espaciadoras. En la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* una copia de la secuencia IS6110 se encuentra dentro de la región DR (Frothingham 1998).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) con IS6110

Aún hoy, el RFLP IS6110 (van Embden 1993) es considerado el método “*gold standard*” para la genotipificación de *M. tuberculosis*. Este método produce un patrón específico de cada cepa en base al número y la posición relativa de IS6110 en el cromosoma. Emplea grandes cantidades de ADN cromosómico íntegro, lo cual implica semanas y hasta meses, dado que *M. tuberculosis* es un microorganismo de crecimiento lento. El ADN es cortado mediante la enzima de restricción PvuII y los fragmentos obtenidos son separados mediante electroforesis, transferidos y fijados en una membrana de nylon cargada positivamente. Para visualizarlos se hibridan con una sonda específica para la región IS6110 preparada de manera casera mediante PCR y marcada con peroxidasa. La peroxidasa cataliza la oxidación del sustrato luminol el cual en presencia de un promotor químico produce una señal luminosa que es detectada por una película de rayos X. Los distintos patrones de bandas obtenidos por este método son comparados luego de la digitalización de la imagen y su análisis por computación.

El RFLP se ubica entre las técnicas con mayor poder de discriminación para *M. tuberculosis*, es muy reproducible, y mostró ser una herramienta de gran valor para confirmar y rastrear el foco de un episodio de contaminación. Sin embargo presenta las desventajas de ser una técnica muy compleja y laboriosa, requiere reactivos importados muy costosos, personal altamente entrenado y un sofisticado programa de computación para comparar los perfiles de bandas obtenidos en distintos experimentos y/o laboratorios (Kremer 1999, Varela 2005).

Para obviar estos inconvenientes se han desarrollado técnicas basadas en la amplificación de segmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos métodos pueden ser aplicados sobre mínimas cantidades de ADN, aun de baja calidad o parcialmente degradado, y suelen arrojar resultados en 24-48 horas (Kremer 2005, Ritacco 2002, Varela 2005). Los más conocidos se describen a continuación.

Spoligotyping

Esta técnica descrita por (Kamerbeek 1997) se basa en la amplificación de la región DR dentro del cromosoma de *M. tuberculosis*. Una vez amplificada la secuencia de interés, se lleva a cabo una hibridación reversa con oligonucleótidos que se encuentran inmovilizados en una membrana de nylon, cada uno de los cuales revela la presencia/ausencia de uno de los 43 segmentos espaciadores variables interpuestos entre los segmentos repetidos de la región DR. Luego de realizada la hibridación, la membrana se incuba con el conjugado estreptavidina-peroxidasa. La detección se realiza mediante un equipo de quimio-luminiscencia exponiendo la membrana a una película de rayos X. El análisis de patrones de bandas obtenidos por este método puede realizarse empleando el *software* BioNumerics v 4.0 (Applied Maths, Ghent, Belgium).

Esta técnica permite identificar taxones dentro del complejo *M. tuberculosis* y es particularmente útil para estudios filogenéticos. Si bien es un método rápido que permite obtener resultados en un día, no es recomendable como único método para la investigación de contaminación cruzada porque tiene bajo poder de discriminación y puede sobreestimar las cepas pertenecientes a un mismo cluster. Patrones distintos descartan contaminación pero patrones idénticos deben ser investigados por otros métodos de genotipificación (Gori 2005).

Double Repetitive Element (DRE-PCR)

Está basado en la amplificación mediante PCR de los segmentos del cromosoma ubicados entre dos elementos repetitivos hipervariables, la secuencia IS6110 que en el genoma *M. tuberculosis* se puede encontrar de 0 a 20 veces, y la región PGRS que se encuentra en al menos 30 copias. Como estas regiones hipervariables varían en número y distribución dentro del ADN, determinando la distancia entre ellos se puede establecer un perfil genético que servirá para comparar cepas dentro de una misma especie. El polimorfismo estará generado por la distancia que existe entre estos dos marcadores y la cantidad de veces que se encuentra cada uno dentro del cromosoma. Los cebadores deben ser complementarios a la porción final de los marcadores genéticos de manera que la región amplificada sea la intermedia (Friedman 1995).

Es una técnica sencilla, ya que el ADN puede extraerse mediante lisis a 100° C de una suspensión bacteriana, seguida de amplificación mediante PCR con cebadores específicos, se corre mediante electroforesis, se siembra en un gel teñido con bromuro de etidio y se visualiza mediante luz UV. Los resultados obtenidos pueden analizarse y compararse mediante el *software* BioNumerics v 4.0 (Applied Maths, Ghent, Belgium).

Mixed-Linker PCR

Este método y su reciente versión simplificada, el *Fast Ligation Mediated PCR* (FLip), son ingeniosas técnicas biotecnológicas que revelan polimorfismos de IS6110. Se basan en la digestión del ADN mediante una enzima de restricción, seguida de una doble amplificación por PCR, la primera con cebadores específicos para el producto de la digestión, y la segunda con cebadores específicos para la región IS6110. En principio, son métodos muy prometedores porque producen rápidamente resultados que, al parecer, son equivalentes a los de RFLP pero no están suficientemente reproducidos ni validados (Haas 1993, Kremer 2005, Reisig 2005).

Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRU)

Las MIRUs son secuencias repetitivas en tandem, que por su tamaño se relacionan con los minisatélites (40-100 pb) y están ubicadas en regiones intergénicas, variando en el número y a veces la secuencia de dichas repeticiones. *M. tuberculosis* H37Rv contiene 41 loci MIRUs, la mayoría de los cuales mostraron ser muy polimórficos entre distintas cepas por lo que la combinación de una selección de los más variables ha sido propuesta para genotipificación. En principio se propuso la utilización de un sistema de 12 loci que fue integrado a sistemas de control de TB en países europeos (Supply 2000). Con el tiempo, esta combinación resultó insuficiente y en la actualidad se aconseja utilizar un sistema de 15 loci para investigaciones epidemiológicas y uno extendido de 24 loci para estudios filogenéticos (Gopaul 2006, Supply 2006, van Deutekom 2005).

Los loci son amplificados mediante multiplex-PCR. Una vez obtenidos los productos, se los somete a electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio, se observa bajo luz UV y se registra mediante fotografía digital. El tamaño de cada producto amplificado se estima comparando con un marcador de peso molecular, y con el ADN de la cepa control H37Rv. Calculando la longitud en pares de bases del locus amplificado, se puede establecer mediante tablas de referencia, el número de repeticiones presentes en este segmento. Según la cantidad de repeticiones se asigna un código a cada locus que sirve para comparar alelos entre diferentes cepas. Cuanto más loci incluye el panel, mayor es su poder de discriminación, el que nunca supera el del RFLP IS6110, a menos que los aislamientos tengan bajo número de copias de IS6110. Esta técnica mostró ser más rápida y sin tantos inconvenientes como el RFLP pero sólo es práctica si se la aplica en una versión automatizada pues su versión manual implica la realización de 12, 15 o 24 geles según el número de MIRUs explorado (Gascoyne-Binzi 2001, Kremer 1999).

Recientemente se compararon los métodos disponibles hasta el momento para la genotipificación del complejo *M. tuberculosis*, concluyendo que RFLP IS6110, FLiP y MIRUs-VNTR son los métodos más reproducibles y con mayor poder de discriminación (Kremer 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos

Se investigaron un total de 115 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* obtenidos entre 1996 y 2003 en 10 laboratorios de la Red Nacional de Tuberculosis. De estos, 108 estaban involucrados en 28 presuntos episodios de contaminación cruzada. Otros siete aislamientos correspondían a pacientes del estudio pero eran previos a los eventos analizados y sus genotipos estaban disponibles para su comparación en la base de datos de nuestro laboratorio (Tabla 2).

Tabla 2: Muestras obtenidas en laboratorios de la Red Nacional de Tuberculosis e investigadas en el Laboratorio Nacional de Referencia INEI ANLIS “Carlos G. Malbrán” bajo sospecha de contaminación cruzada, 1996-2003.

Hospital	Ubicación	Episodio No.	Año	No. de aislamientos analizados
I	Provincia de Buenos Aires	1	1996	2
		2	1997	2
		3	1998	5*
		4	2000	2
II	Ciudad de Buenos Aires	5	1999	5
		6	1999	3
		7	1999	2
		8	1999	6**
		9	1999	5*
		10	2000	2
		11	2002	3*
		12	2002	3
		13	2003	2
		14	2003	3
III	Ciudad Bs. As.	15	1997	12
		16	2002	2
IV	Ciudad Bs. As.	17	1998	2
		18	2000	3
V	Ciudad Bs. As.	19	2000	3*
VI	Ciudad Bs. As.	20	2000	2
		21	2001	3
VII	Prov. Bs. As.	22	2000-2001	3
		23	2000-2001	5
		24	2000-2001	7
VIII	Ciudad Bs. As.	25	2000	3*
		26	2000	3
IX	Ciudad Bs. As.	27	1999	7
X	Neuquén	28	2003	15

* los asteriscos señalan aislamientos previos de pacientes involucrados en el estudio cuyos genotipos estaban depositados en nuestra base de datos de genotipos.

Todos los aislamientos recibidos en el laboratorio de referencia fueron repicados en medio Löwenstein-Jensen, incubados a 37 °C e identificados mediante pruebas bioquímicas. Los aislamientos de los eventos ocurridos en 2002-2003 fueron procesados para su genotipificación en el marco del presente proyecto de tesis. Los aislamientos de

los eventos comprendidos entre 1996 y 2001 habían sido remitidos al laboratorio y genotipificados con anterioridad.

Genotipificación

RFLP IS6110

El *fingerprinting* del ADN de *M. tuberculosis* mediante RFLP IS6110 se realizó según el protocolo estándar internacional (van Embden 1993).

Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó a partir de repiques frescos con desarrollo abundante (+++), de la siguiente manera: 2 ansadas del cultivo bacteriano fueron colocadas en un tubo Eppendorf de 1,5 ml de capacidad con 400 µl de solución tamponada Tris-EDTA (TE) 1X (Tris-ClH 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), e incubadas 20 minutos a 80 °C para lograr la inactivación bacteriana. Se agregaron 50 µl de lisozima (concentración final 1 mg/ml) se mezcló mediante vórtex y se incubó al menos 1 hora a 37 °C. Se agregó a la mezcla 75 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) (10 g/100ml) y proteinasa K (20 mg/ml), se mezcló mediante vórtex y se incubó durante 10 minutos a 65 °C. Luego se agregó un volumen de 100 µl de ClNa 5 M y 100 µl de N-cetil-N,N,N-trimetil bromuro de amonio/cloruro de sodio (CTBA/ClNa) (4,1 g NaCl y 10 g CTAB en 100 ml de H₂O destilada) previamente calentada con el objetivo de remover los restos de membranas celulares, desnaturalizar proteínas y formar un complejo entre el CTBA y los polisacáridos. La mezcla fue agitada en vórtex vigorosamente hasta tomar un aspecto lechoso y luego incubada durante 10 minutos a 65 °C. La extracción de ADN se realizó mediante la adición de 750 µl de una mezcla de cloroformo/ alcohol isoamílico (24 volúmenes de cloroformo + 1 volumen de alcohol isoamílico) agitando mediante vórtex por lo menos 10 segundos. Después de centrifugar durante 10 minutos a 11000 g, el sobrenadante acuoso que contenía el ADN fue transferido a un tubo Eppendorf de 1,5 ml de capacidad. La precipitación del ADN se realizó mediante el agregado de 450 µl de isopropanol e incubación durante al menos una hora a -20 °C. El tubo con el ADN así precipitado se centrifugó durante 15 minutos a 11000 g. Se descartó el sobrenadante y el ADN adherido al fondo del tubo fue sometido a dos lavados con 1 ml de etanol 70% frío y centrifugación. Luego del segundo centrifugado se descartó el alcohol sobrenadante y el sedimento se dejó secar 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez seco, el ADN se resuspendió en volúmenes de 20 a 40 µl de solución tamponada TE 1X, según la cantidad de sedimento obtenido.

La estimación semicuantitativa de la concentración del ADN obtenido se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % peso/volumen durante 1 hora a 100 V. La cantidad absoluta óptima de ADN a digerir fue de 4,5 µg.

Restricción enzimática

La digestión con la enzima de restricción *PvuII* se realizó de la siguiente forma: se mezclaron 2 µl de solución tamponada para digestión (provista por el equipo), 1 µl de enzima de restricción *PvuII* (10 U/µl) (Invitrogen, Carlsbad, USA), 4,5 µg de ADN y agua destilada estéril para llegar a un volumen final de 20 µl/vial. La mezcla fue agitada mediante vórtex, centrifugada brevemente e incubada en baño a 37 °C durante 1 hora.

Se incluyó como control de digestión la cepa Mt14323 de referencia internacional para RFLP IS6110 (gentileza Dick van Soolingen), la cual también será utilizada como marcador externo para normalizar las distancias de corrida electroforética.

Estimación de las muestras digeridas

La acción de la enzima fue controlada mediante separación electroforética de los fragmentos de restricción en gel de agarosa preparado al 0,8 % peso/volumen en tampón TBE 1X (89 mM de Tris, 89 mM de Acido Bórico y 2,5 mM de EDTA disueltos en agua destilada) durante 2 horas a 100V. Además de evaluar la calidad de la digestión, este paso permitió ajustar la estimación del volumen de digesto a sembrar en el gel definitivo, teniendo en cuenta que la cantidad absoluta óptima de ADN a transferir según el protocolo estándar internacional es 2 µg.

Electroforesis

El gel definitivo destinado a la transferencia se preparó como los anteriores con agarosa al 0,8 % peso/volumen. Un marcador comercial de ADN (fago λ digerido con Hind III (Invitrogen, Carlsbad, USA) fue sembrado en la primera calle del gel. En la segunda calle, en la calle central y en la última fue sembrado el digesto de la cepa de referencia Mt 14323. La electroforesis se llevó a cabo los primeros 10 minutos a 100 V y luego a 20 V durante la noche (16 horas aproximadamente). La electroforesis se consideró completa cuando se constató que la banda de 2 kbp del marcador λ Hind III alcanzó una longitud de migración de 7 cm desde el pocillo de siembra.

Transferencia (Southern blotting) y fijación del ADN a la membrana

Para desnaturalizar el ADN y facilitar su transferencia a una membrana, el gel fue colocado en el tansiluminador UV hasta que la fluorescencia producida por el Bromuro de Etidio desapareció casi por completo (5 a 10 minutos). Luego se lo sumergió durante 10 minutos en solución de CIH 0,25 M, se lo lavó con abundante agua destilada y se lo sumergió en NaOH 0,4M por dos períodos consecutivos de 20 minutos seguidos de lavados con agua destilada.

El ADN fue transferido a una membrana de nylon por vacío en un equipo ad hoc (*vacuum blotter*) acoplado a una bomba de vacío (Hoeffler, Germany). Se colocó un papel de filtro embebido en agua destilada sobre el soporte poroso del aparato (ver [Figura 3](#)). Sobre el papel de filtro se colocó la membrana de nylon cargada positivamente (*Hybond N+ membrane, Amersham International, Buckinghamshire, UK*), previamente cortada del tamaño exacto del gel y embebida en agua destilada. Por encima de la membrana fue extendida una máscara de teflón en forma de marco. Con mucha precaución fue colocado el gel sobre esta máscara, de manera que las calles queden en contacto con la membrana y los bordes por encima de la máscara de teflón. Mediante un papel absorbente, los pozos, los bordes del gel y toda su superficie fueron secados. Luego, con agarosa al 1% los pozos y todos sus bordes fueron sellados para garantizar el vacío. Cuando la agarosa utilizada para sellar solidificó, el gel fue cubierto con 400 ml de solución tamponada SSPE 10X (0,1M Na₂HPO₄* 2 H₂O, 1,8 M NaCl y 10 mM EDTA en agua destilada pH 7,4). La bomba de vacío fue conectada primero a una presión de 3KPa durante 5 minutos y luego a 17 KPa hasta que 200 ml de la solución tamponada fueran succionados a la cámara inferior del aparato.

Una vez completada la transferencia, el ADN fue fijado a la membrana. A tal fin, ésta fue apoyada sobre un papel Whatman embebido en NaOH 0.4 M y luego de 2 minutos lavada con solución tamponada SSC 5X (preparada por dilución de la solución 20 X (3 M de ClNa y 0,3 M de citrato de Na disueltos en agua destilada. El pH 7 fue ajustado con NaOH 5M) durante 5 minutos y de esta manera quedó lista para la hibridación.

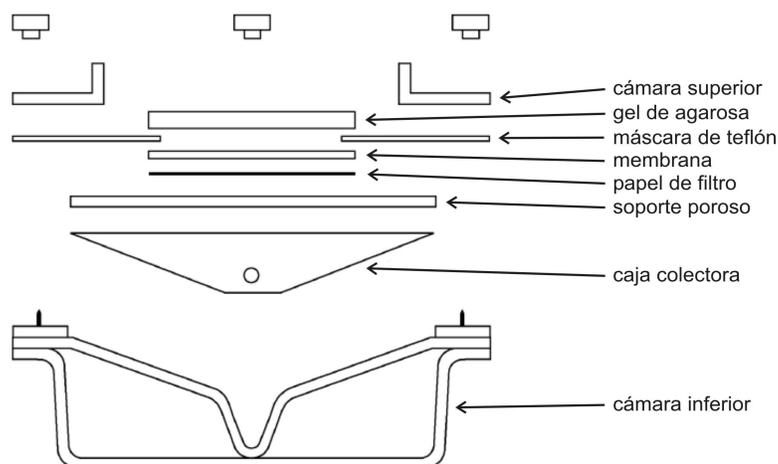


Figura 3: Representación esquemática del equipo para transferencia de geles.

Preparación, purificación y marcado de la sonda

La sonda fue preparada en nuestro laboratorio mediante PCR utilizando un par de cebadores específicos para un segmento de 245 bp de la secuencia de inserción IS6110 (forward: 5' CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC; reverse: 5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA) en el segmento ubicado a la izquierda del único sitio de restricción que esta secuencia de inserción presenta para la enzima PvuII. La mezcla de PCR consistió en 5 µl de solución tamponada 10X, 4 µl de una mezcla de los 4 dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, USA), 5 µl de cada uno de ambos cebadores a 50 ng/µl, 0,1 µl de Taq polimerasa (5U/µl) (Invitrogen), 10 µl de ADN templado y cantidad suficiente de agua destilada para un volumen final de 50 µl /vial. Como templado se usaron 10 µl de ADN cromosomal de la cepa de referencia Mt 14323 a 10 ng /µl (cantidad absoluta de ADN: 10-100 ng). La reacción de PCR se realizó en un ciclador térmico (Mastercycler 384, Eppendorf, Hamburg, Germany) con un paso inicial de desnaturalización de 3 minutos a 96 °C, 30 ciclos consecutivos de desnaturalización (96 °C, 1 minuto), anillado (65 °C, 1 minuto) y extensión (72 °C, 1 minuto) y un paso final de extensión de 5 minutos a 72 °C.

Previo a su purificación, el producto amplificado fue sometido a electroforesis en gel de agarosa 2 % durante 5 horas a 100 V para separar completamente la banda específica de 245 pb de los restos de templado, cebadores, eventuales productos de amplificación inespecífica, etc. El gel teñido con bromuro de etidio fue visualizado en un transiluminador de luz UV y la porción del gel que contenía la banda específica fue escindida con un bisturí, colocada en el interior de un tubo Eppendorf de 1,5 ml y pesada.

La purificación de la sonda fue realizada mediante un equipo comercial (QuiaQuick, Qiagen GMBH, Hilden, Germany). Al tubo conteniendo la porción de gel con la banda específica se agregaron 3 volúmenes de solución tamponada QG por cada volumen de gel. La solución QG, con altas concentraciones de sales y pH óptimo de 7,5 brinda las condiciones adecuadas para que el ADN se absorba a la membrana de sílica de la columna. Para solubilizar completamente la agarosa se incubó a 50 °C durante 10 min y se mezcló con vórtex. Una vez lograda la disolución se comprobó que el pH fuese el correcto y se agregó un volumen de isopropanol para incrementar la recuperación de ADN. La solución se colocó en una columna y fue centrifugada un minuto. El líquido eliminado fue descartado y la columna fue colocada nuevamente en el tubo. Se agregaron 75 µl de solución tamponada PE (solución con etanol) y se centrifugó durante un minuto y se eliminó el líquido eluido. La columna fue colocada en un tubo limpio y el ADN fue eluido de la membrana de sílica mediante el agregado de 50 µl de agua destilada. Se dejó reposar durante un minuto y se centrifugó durante un minuto. La concentración de la sonda se estimó en gel de agarosa al 2% comparando con un marcador comercial de tamaño de bandas (Phi X174 HAEII, Invitrogen, Carlsbad, USA).

El marcado de la sonda se realizó mediante el equipo ECL de marcado y detección quimiluminiscente (Amersham International, Buckinghamshire, UK). La sonda fue diluida con H₂O destilada provista a una concentración de 10 ng/µl, desnaturalizada mediante calor (99 °C, 5 minutos) e inmediatamente colocada en baño de hielo durante 1 minuto para evitar su renaturalización. Una vez centrifugada, se le agregó peroxidasa de rabanito del kit ECL, en la misma cantidad que la sonda diluida (ej: 10 µl sonda + 30 µl de H₂O + 40ul de peroxidasa), luego de mezclar suavemente se agregó la misma cantidad de glutaraldehído del kit (ej: 40 µl de glutaraldehído). Luego se mezcló mediante vórtex esta solución y fue incubada a 37 °C durante 20 minutos para lograr la unión permanente de la peroxidasa a la sonda.

Hibridación y lavados

La solución tamponada para hibridación (ECL kit, Amersham) se preparó agregando a la solución madre provista por el equipo un agente bloqueante, también provisto por el equipo, en una concentración de 5% p/v agitando constantemente. Luego se le agregó ClNa 5 M para obtener una concentración final de 0,5 M. La solución fue calentada a 42 °C, separada en alícuotas de 10 ml y conservada a -20 °C hasta su uso.

La pre-hibridación consistió en la incubación de la membrana con 10 ml de solución tamponada para hibridación en botella de vidrio en horno específico para este fin, con sistema de rotación durante 20 minutos a 42 °C. Luego del agregado de la sonda marcada, la hibridación se llevó a cabo durante 18 horas a 42 °C con rotación a 6 rpm.

El lavado de astringencia se realizó en la misma botella de hibridación con 250 ml de solución de lavado primaria (SSC 3X/SDS 0,1%) previamente calentada a 55 °C. La botella fue incubada en horno a 55 °C durante 10 minutos rotando a 6 rpm; este paso se repitió cambiando la solución de lavado primaria. Mediante pinzas la membrana fue extraída de la botella y colocada en una bandeja de plástico con 250 ml de solución de lavado secundaria (SSC 2X) y agitada durante 5 minutos a temperatura ambiente. El lavado secundario se repitió cambiando la solución, quedando de esta forma la membrana lista para la detección.

Detección

Para la detección fueron utilizados los reactivos de detección 1 y 2 del equipo ECL (Amersham International, Buckinghamshire, UK). El primero contiene peróxido de hidrógeno y el segundo contiene luminol (sustrato cromógeno que emite luz azul al ser oxidado por la degradación del peróxido). Diez mililitros de cada uno de estos reactivos fueron mezclados en forma extemporánea y aplicados sobre la membrana escurrida y depositada en un recipiente exclusivamente destinado a esta operación. La membrana fue dejada en contacto con los reactivos durante un minuto con movimientos permanentes procurando que toda su superficie tomara contacto con la mezcla de líquidos. Nuevamente fue escurrida y colocada sobre un soporte de acetato. Rápidamente la membrana y su soporte fueron envueltos en una membrana plástica adhesiva evitando la formación de burbujas de aire y la filtración de líquidos. Así preparada la membrana fue expuesta durante 120 minutos a una placa de rayos X virgen marcada en una de sus esquinas para reconocer su orientación dentro de un *cassette* sellado a prueba de luz.

Spoligotyping (*spacer oligo typing*)

Extracción de ADN

Se empleó el ADN extraído según el método convencional descrito más arriba para RFLP o bien un método más sencillo de hervido y congelado como se explica a continuación: una ansada de colonia bacteriana crecida en medio Löwenstein-Jensen se colocó en 1 ml de agua estéril y se colocó 10 minutos en agua hirviendo. Transcurrido ese tiempo se dejó a -20 °C durante toda la noche. Posteriormente las muestras se centrifugaron 5 minutos a 11000g y el sobrenadante que contenía en ADN, se colocó en un tubo limpio y rotulado para ser utilizado en la amplificación.

Amplificación del segmento DR

Para la amplificación, el ADN hervido se empleó sin diluir y el ADN extraído mediante el método convencional se diluyó a 10 ng/ µl, se realizó la amplificación del segmento DR según indicaciones del equipo comercial *Isogen Life Science* para *spoligotyping*, *Belgium*).

Los cebadores utilizados fueron: DRa 5' biotilado (GGTTTTGGGTCTGACGAC) y DRb (CCGAGAGGGGACGGAAAC). La mezcla de PCR consistió en: 5 µl de solución tamponada 10X, 4 µl de la mezcla de dNTPs (200 uM de c/u), 4 µl de cada uno de los cebadores de (20 pmoles), 0,1 µl de Taq polimerasa (5 U/µl) (Invitrogen, Carlsbad, USA), 5 µl de ADN extracción convencional (2 µl de ADN obtenido por hervido) y cantidad necesaria de agua destilada estéril para llegar a un volumen final de 50 µl /vial.

La reacción de amplificación se realizó en un ciclador térmico (Mastercycler 384, Eppendorf, Hamburg, Germany) con un paso inicial de desnaturalización a 3 minutos a 96 °C luego 20 ciclos consecutivos de desnaturalización (96 °C 1 minuto), anillado (55 °C, 1 minuto) y extensión (72 °C, 30 segundos) y un paso final de extensión de 5 minutos a 72 °C.

Hibridación de los productos amplificados

Una vez realizada la amplificación, los productos obtenidos fueron hibridados con los 43 oligonucleótidos inmovilizados en la membrana que corresponden a las secuencias de los espaciadores entre los DR para luego visualizar la presencia o ausencia de hibridación con cada uno de los espaciadores mediante la reacción con estreptavidina-peroxidasa y revelado mediante el mismo sistema ECL de detección quimioluminiscente empleado para RFLP.

Se tomaron 20 µl del producto amplificado y se colocaron en un tubo Eppendorf con 150 µl de solución SSPE 2X (preparada por dilución de la solución SSPE 20X: Na₂HPO₄*2H₂O 0,2M, ClNa 3,6M, EDTA 20mM, pH 7,4)/ SDS 0,1%. Esta dilución del producto de PCR fue calentada a 99 °C para desnaturalizar el ADN y colocada luego en hielo para evitar su renaturalización.

Antes de su utilización, la membrana en la cual están inmovilizadas las distintas secuencias de los espaciadores presentes entre los DRs se incubó durante 15 min en solución SSPE 2X/ SDS 0,1% a 60 °C. Luego se la colocó dentro del equipo especial para hibridación en línea (*miniblotter*) de tal modo que los canales donde se siembra el ADN queden perpendiculares a las líneas de oligonucleótidos previamente fijados a la membrana. Estos canales fueron aspirados por vacío antes de poner las muestras para eliminar los restos de líquidos que pudieran contener. Posteriormente, los productos de la amplificación diluidos fueron sembrados con mucha precaución en los orificios *ad hoc*, evitando que se formen burbujas en el interior de los canales.

La hibridación se desarrolló colocando el miniblotter en una superficie plana y dejándolo 1 hora en horno a 60 °C sin agitarlo ni moverlo para evitar contaminación entre las muestras. Transcurrido este tiempo, se aspiró por vacío cada uno de los canales y, una vez desarmado el sistema, la membrana fue retirada del equipo mediante pinzas de punta roma. La membrana fue sometida a dos lavados consecutivos con 250 ml de solución SSPE 2X/ SDS 0,5% a 60 °C durante 10 minutos. Finalizados los lavados, la membrana se enrolló y se colocó en un tubo donde se esperó que alcance temperatura ambiente para evitar la inactivación de la peroxidasa en el próximo paso.

En el último paso, 2,5 µl de conjugado estreptavidina- peroxidasa (500 U/ ml) y 10 ml de SSPE 2X/ SDS 0,5% fueron mezclados. La membrana fue incubada con esta mezcla durante 45-60 minutos a 42 °C. Luego se realizaron dos lavados consecutivos con solución SSPE 2X a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Detección

Para la detección fueron utilizados los reactivos 1 y 2 del equipo ECL (Amersham International, Buckinghamshire, UK). Diez mililitros de cada uno de estos reactivos fueron mezclados en forma extemporánea y aplicados sobre la membrana escurrida y depositada en un recipiente exclusivamente destinado a esta operación. La membrana fue dejada en contacto con los reactivos durante un minuto con movimientos permanentes procurando que toda su superficie tomara contacto con la mezcla de líquidos. Nuevamente fue escurrida y colocada sobre un soporte. Rápidamente la membrana y su soporte fueron envueltos en un papel plástico adhesivo evitando la formación de burbujas de aire y la filtración de líquidos. Así preparada la membrana fue expuesta durante 20 minutos a una placa de rayos X virgen marcada en una de sus esquinas para reconocer su orientación dentro de un *cassette* sellado a prueba de luz.

DRE-PCR

Extracción del ADN

La extracción mediante el método de hervido y congelado descrito para spoligotyping.

Amplificación

La mezcla para la reacción de amplificación se preparó de la siguiente manera: 5 µl de solución tamponada 10x, 4 µl de mezcla de dNTPs (200 uM de c/u), 2,5 µl de cada cebador (0,5 pM), 0,1 µl de Taq polimerasa (5 U/µl) (Invitrogen, Carlsbad, USA), 10 µl de ADN templado (cantidad absoluta: 10-100 ng) y cantidad necesaria de agua estéril para un volumen de 50 µl /vial. Los cebadores utilizados fueron: Ris 1, 5'-GGC-TGA-GGT-CTC-AGA-TCA-G; Ris 2,5'-ACC-CCA-TCC-TTT-CCA-AGA-AC; Pntb 1, 5'-CCG-TTG-CCG-TAC-AGC-TG; y Pntb 2, 5'-CCT-AGC-CGA-ACC-CTT-TG.

Las muestras de ADN fueron desnaturalizadas mediante incubación durante 10 minutos a 95 °C, luego se llevaron a cabo 30 ciclos de: desnaturalización (94 °C 1 minuto), anillado (56 °C 2 minutos), extensión (72 °C 1 minuto).

Electroforesis

El producto amplificado se sembró en un gel de agarosa preparado al 2% peso/volumen, teñido con Bromuro de Etidio. Se sembró en la mitad del gel un marcador comercial de 100 bp (Invitrogen, Carlsbad, USA) para comparar el tamaño de las bandas obtenidas.

La electroforesis se llevó a cabo durante 5 horas a 100 V. Los patrones obtenidos se visualizaron mediante luz UV y se les tomó una fotografía para el posterior análisis computarizado.

Análisis computarizado de genotipos

Una vez reveladas las placas radiográficas (RFLP IS6110 y Spoligotyping) o fotográficas (DRE-PCR) con los perfiles genéticos de los diferentes aislamientos, las imágenes fueron digitalizadas con resolución de 300 dpi y 256 tonos de gris (impresora Hewlett Packard multifunción 1200). Las imágenes así obtenidas fueron registradas en formato tiff e ingresadas a la base de datos del *software* BioNumerics v 4.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

La normalización intra-e inter-experimento se realizó mediante el empleo de estándares de tamaño de banda conocida en tres calles del gel: las dos calles laterales y la calle central. El estándar empleado en los experimentos de RFLP IS6110 fue la cepa de referencia internacional Mt 14323 (van Embden 1993). En el DRE-PCR se empleó un marcador comercial de 100 bp (Invitrogen, Carlsbad, USA). Para spoligotyping se utilizaron como estándares las cepas *M. tuberculosis* H37RV, y *M. bovis* BCG.

La comparación entre los patrones de bandas obtenidos por los distintos métodos se realizó aplicando el coeficiente Dice para el cálculo de la matriz de similitud y el algoritmo UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*) para la construcción del dendrograma. Los patrones fueron considerados idénticos cuando presentaron similitud 100% con una tolerancia de 1% de error (Heersma 1998).

RESULTADOS

Se investigaron 28 episodios bajo sospecha de contaminación cruzada ocurridos entre 1996 y 2003 en 10 laboratorios de la Red Nacional de Tuberculosis, los que incluyeron un total de 115 aislamientos de *M. tuberculosis*. A continuación se describen brevemente las características de los hospitales involucrados y se analizan los resultados a la luz de las evidencias clínicas y de laboratorio disponibles de cada uno de los episodios.

Hospital I

Se trata de un hospital general ubicado en el Conurbano Bonaerense. Durante el período de estudio, el laboratorio procesaba un bajo número de muestras clínicas para diagnóstico de *M. tuberculosis* (<40 por mes) utilizando el método convencional de cultivo en medio sólido de Lowenstein-Jensen.

Tabla 3: Información clínica y de laboratorio de cuatro eventos sospechados de contaminación cruzada ocurridos en el Hospital I.

Evento	Mes/ Año	Pacien te	Datos de laboratorio				Historia clínica		
			Cultivo No.	Muestra	Examen directo	RFLP	Antecedentes	HIV	Evolución
1	07/ 1996	A	1	Espuito	+++	Iguales	Sospecha de TB	Neg	TB confirmada
		B	2	Espuito	-		Sospecha de TB	Pos	<i>P. carinii</i>
2	05/ 1997	A	3	Espuito	+++	Iguales	Sospecha de TB	Neg	TB confirmada
		B	4	Lavado Gástrico	-		Síntomas inespecíficos	Neg	Asma
3	02/ 1998	A	5	Espuito	++	Iguales	Sospecha de TB	Neg	TB confirmada
		B	6	Orina	-		Síntomas inespecíficos	Neg	Cistitis por <i>E. coli</i>
		C	7	Espuito	-		TB en tratamiento	Pos	<i>C. neoformans</i>
		D	8	Espuito	-		TB en tratamiento	Neg	Curación
			9*	Espuito (previo)	++	Otro	Sospecha de TB	Neg	TB confirmada
4	08/ 2000	A	10	Espuito	++	Diferentes	Sospecha de TB	Neg	Mejoría con tratamiento
		B	11	Espuito	-		Sospecha de TB	Neg	Mejoría con tratamiento

Examen directo +: 10 a 99 bacilos en 100 campos observados, ++: 1 a 10 bacilos por campo en 50 campos observados, +++: más de 10 bacilos por campo en 25 campos observados (OPS 2008); Neg: negativo. TB: tuberculosis; Pos: positivo; Neg: negativo; *P. carinii*: *Pneumocystis carinii*; *E. coli*: *Escherichia coli*; *C. neoformans*: *Cryptococcus neoformans*.

En la **Tabla 3** se presenta la información disponible de los eventos investigados y en la **Figura 4** se muestran los perfiles RFLP de los aislamientos correspondientes. Las muestras habían sido sometidas a identificación bioquímica y pruebas de sensibilidad a drogas anti-tuberculosis. Las muestras involucradas en cada uno de los 4 eventos investigados, habían sido procesadas en el transcurso de la misma semana. La sospecha de contaminación cruzada surgió en la profesional a cargo del laboratorio, quien trabajaba en estrecha colaboración con el equipo médico del hospital. En la **Tabla 3** se describen las características clínicas y de laboratorio de los casos involucrados en los cuatro eventos.

Los aislamientos de todos los episodios fueron caracterizados como *M. tuberculosis* sensible a las cinco drogas de primera línea: isoniacida, rifampicina, estreptomina, etambutol y pirazinamida. Los cultivos de las muestras positivas al examen microscópico directo desarrollaron más de 50 colonias en el medio sólido, mientras que las muestras negativas al examen directo, desarrollaron menos de 5 colonias.

En los eventos 1, 2 y 3 el diagnóstico de tuberculosis se confirmó en el paciente con muestra positiva al examen microscópico directo de esputo y se descartó en los demás pacientes con muestras negativas al examen directo. En el evento 4, los perfiles genéticos diferentes permitieron descartar la sospecha de contaminación de laboratorio.

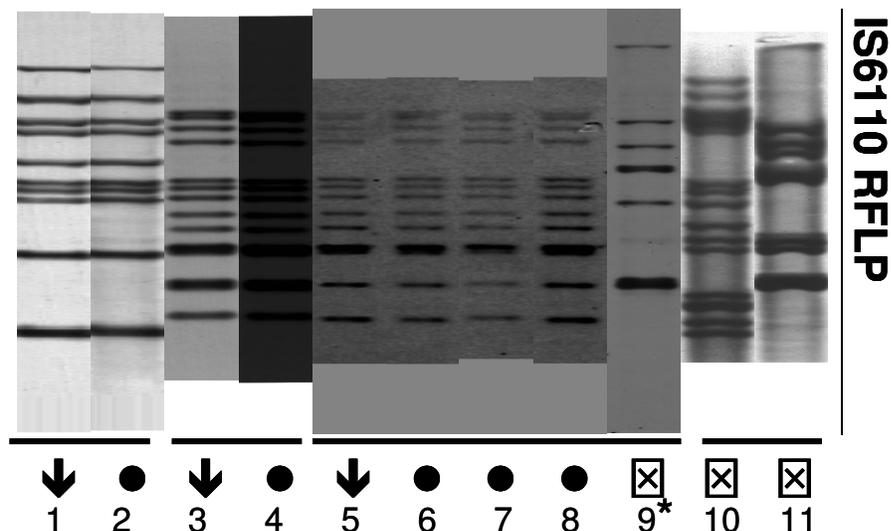


Figura 4. Fingerprinting según IS6110 de 11 aislamientos involucrados en 4 presuntos eventos de contaminación cruzada de laboratorio ocurridos en el hospital I entre 1996 y 2000. Las barras horizontales al pie agrupan los aislamientos de un mismo evento. Los números corresponden a los mismos números de aislamientos en la Tabla 1. Las flechas señalan los perfiles genéticos de las cepas causantes de contaminación. Los círculos indican los cultivos contaminados. El perfil 8 (contaminado) corresponde al control de tratamiento de un paciente con evolución favorable y falso cultivo positivo; el perfil 9* corresponde a un aislamiento previo del mismo paciente. Las calles 10 y 11 corresponden a los perfiles de dos aislamientos obtenidos en 2000 de dos pacientes bajo sospecha de contaminación que fue descartada por RFLP. Imágenes digitalizadas y analizadas mediante el *software* BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Belgium).

El aislamiento 8 (falso positivo) correspondió a un cultivo rutinario de control durante el transcurso del tratamiento del paciente D, evento 3. El paciente presentaba buena respuesta al tratamiento y en la base de datos de nuestro laboratorio se pudo constatar que el perfil genético del aislamiento original de este paciente era claramente diferente al perfil de la cepa involucrada en este evento (Tabla 3, Figura 4).

En el período comprendido entre 1996 y 1998, este laboratorio declaró un índice de contaminación de 2.7% (5/183). En un análisis retrospectivo, se atribuyó el error de laboratorio a una presunta contaminación con *M. tuberculosis* de los reactivos utilizados en el proceso de descontaminación de las muestras. A partir de 1999 se adoptó un protocolo más estricto de trabajo, que incluyó el fraccionamiento de los reactivos de descontaminación y el procesamiento individual de las muestras. Estos cambios operacionales tuvieron el efecto deseado pues entre 1999 y 2003 hubo un solo evento sospechoso de contaminación que fue descartado por RFLP (Tabla 3, evento 4). En todos los casos, incluso este último, la evolución clínica de los pacientes corroboró los resultados de la genotipificación con RFLP IS6110.

Hospital II

Se trata de un hospital pediátrico de alta complejidad, ubicado en la Ciudad de Buenos Aires. En el laboratorio se procesa una gran cantidad de muestras para el cultivo de micobacterias y esta institución fue pionera en la implementación de sistemas automatizados para el cultivo de micobacterias. Hasta 2001, empleó el sistema radiométrico semi-automático Bactec 460 (Becton Dickinson, Sparks, MD). A partir de 2002 se implementó el sistema de cultivo automatizado MBbact (ahora denominado BacT Alert 3D, BioMérieux).

Se analizaron un total de 34 muestras correspondientes a 10 eventos ocurridos entre 1999 y 2003. Todos ellos habían sido sospechados de contaminación cruzada por la profesional a cargo del laboratorio (Casimir 2004). En la Tabla 4 se sintetiza la información disponible de los 10 eventos.

En este hospital se confirmó la existencia de contaminación cruzada de muestras en 8 de los 10 episodios estudiados (Tabla eventos 5, 6, 8-12 y 14). En los dos episodios restantes (7 y 13), la hipótesis de contaminación fue rechazada. Algunas muestras incluidas en algunos de los eventos no resultaron contaminadas (muestra 21 episodio 9, muestra 29 episodio 12). En todos los casos en los que se aplicó más de un método de genotipificación, los resultados de los distintos métodos fueron congruentes entre sí. En los eventos que involucraron aislamientos con resistencia a drogas, los resultados de las pruebas de sensibilidad concordaron con los de genotipificación y contribuyeron a confirmar o descartar la sospecha.

La Figura 5 representa los perfiles genéticos de los 23 aislamientos involucrados en los eventos ocurridos entre 1999 y 2000, período durante el cual aún se empleaba el método radiométrico de cultivo. Nótese que en los eventos 8 a 10, los patrones DRE-PCR que deberían ser idénticos presentan ligeras variaciones o matices de intensidad en algunas bandas.

Tabla 4. Datos de laboratorio de 10 eventos sospechados de contaminación cruzada ocurridos en el Hospital II en el período 1999-2003.

Evento	Mes/ Año	Pacien te	Cultivo No.	Muestra	Examen directo	Sensibilidad a drogas	Patrones		
							RFLP	Spoligo	DRE- PCR
5	01/ 1999	A	1	Lavado gástrico	++	Sensible			
		B	2	nd	-	Sensible			
		C	3	Lavado gástrico	-	Sensible	Iguales	Iguales	Iguales
		D	4	nd	-	Sensible			
		E	5	Lavado gástrico	-	Sensible			
6	02/ 1999	A	6	Ganglio	+	Sensible	banda extra		
		B	7	Lavado gástrico	-	Sensible	Iguales	Iguales	Iguales
		C	8	Lavado gástrico	-	Sensible			
7	03/ 1999	D	9	Espuito	++	Sensible	Diferentes	nd	nd
		B	10	Lavado gástrico	-	Sensible			
8	03/ 1999		11	Lavado gástrico	++	Sensible			
		A	12*	Ganglio (previo)	+	Sensible			
			13*	Lavado gástrico (previo)	++	Sensible	Iguales	nd	Iguales
		B	14	Lavado gástrico	-	Sensible			
		C	15	Lavado gástrico	-	Sensible			
9	09/ 1999		16	Lavado gástrico	-	Sensible			
		A	17	Lavado gástrico	+	Resistente a SM			
			18*	Lavado gástrico (previo)	++	Resistente a SM	Iguales	Iguales	Iguales
		B	19	Lavado gástrico	-	Resistente a SM			
		C	20	Lavado gástrico	-	Resistente a SM	Otro	Otro	Otro
10	10/ 2000	A	21	Lavado gástrico	-	Sensible			
			22	Pulmonar	++	Resistente a INH	Iguales	Iguales	Iguales
11	05/ 2002	B	23	Ganglio	-	Resistente a INH			
		A	24	Espuito	++	Resistente a INH	Iguales	Iguales	nd
		B	25	Lavado gástrico	-	Resistente a INH			
			26*	Lavado gástrico (previo)	+	Multi- Resistente	Otro	Otro	
12	08/ 2002	A	27	Lavado gástrico	++	Resistente a INH	Iguales		
		B	28	Lavado gástrico	-	Resistente a INH		nd	nd
		C	29	Lavado gástrico	-	Sensible	Otro		
13	02/ 2003	A	30	Espuito (adulto)	++	Resistente a PZA	Diferentes	nd	nd
		B	31	Lavado gástrico	-	Sensible			
14	09/ 2003	A	32	Lavado gástrico	+	Sensible			
		B	33	Lavado gástrico	-	Sensible	Iguales	Iguales	nd
		C	34	nd	-	Sensible			

Spoligo: spoligotyping; nd: no determinado; Sensible indica sensible a todas las drogas; SM: estreptomicina; INH: isoniacida; PZA: pirazinamida.

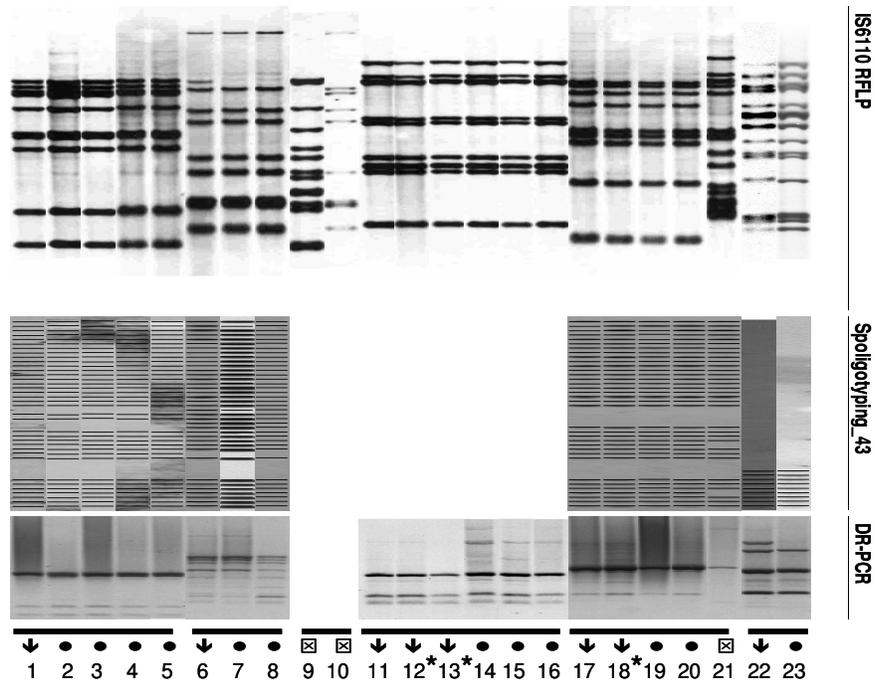


Figura 5. Perfiles de RFLP IS6110, spoligotyping y DRE-PCR disponibles de 23 aislamientos involucrados en seis presuntos eventos de contaminación cruzada de laboratorio ocurridos en el Hospital II en el período 1999-2000, durante el cual en este hospital se empleaba el sistema radiométrico de cultivo. Las barras horizontales al pie agrupan los aislamientos de cada evento. Los números corresponden a los números de aislamientos de la Tabla 4. Las flechas señalan los perfiles genéticos de las cepas causantes de contaminación (calles 11, 12* y 13* corresponden a tres aislamientos del mismo paciente; calles 17 y 18* corresponden a dos aislamientos del mismo paciente; los asteriscos indican aislamientos previos): Los círculos indican los cultivos contaminados. Las cruces recuadradas (calles 9, 10 y 21) indican cultivos en los que se descartó la sospecha mediante genotipificación. Imágenes digitalizadas y analizadas mediante el *software* BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Belgium).

No ocurrió ningún evento sospechoso de contaminación de laboratorio durante 2001. La **Figura 6** muestra los genotipos de los 11 aislamientos de los episodios sospechados de contaminación después de la implementación, en 2002, del sistema automatizado no invasivo de cultivo. El cultivo contaminado de calle 25 es un control de tratamiento de un paciente con tuberculosis multirresistente con buena evolución cuyo aislamiento original (calle 26*) tenía el genotipo de una notoria cepa de brote hospitalario (**Ritacco 1997**). Particularmente sugestivo de contaminación fue el evento 13 ocurrido en 2003, compuesto por dos aislamientos con patrones RFLP diferentes, lo que descartó la sospecha. La muestra con examen directo positivo presunta contaminante correspondía a un paciente adulto con cultivo resistente a pirazinamida. La presunta muestra contaminada resultó ser un verdadero cultivo positivo sensible a drogas de primera línea obtenido del lavado gástrico de un niño HIV positivo quien, por otra parte, tenía dos hemocultivos negativos (**Tabla 4**). Uno de los cultivos involucrados en el evento 9 y otro involucrado en el evento 12 difirieron en genotipo y en perfil de sensibilidad respecto del respectivo aislamiento contaminante, es decir, correspondieron a casos reales de tuberculosis dentro de un evento real de contaminación cruzada.

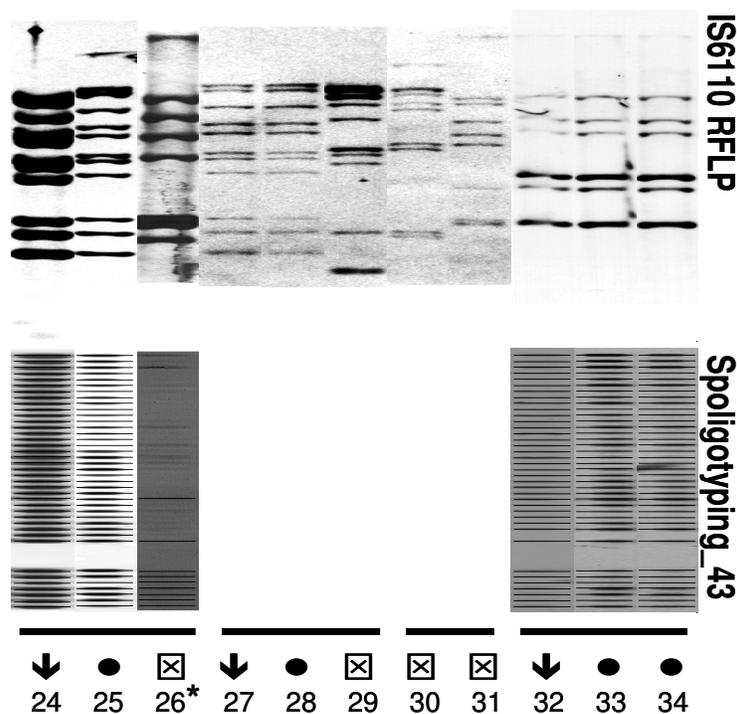


Figura 6. Perfiles de RFLP IS6110 y spoligotyping disponibles de 11 aislamientos involucrados en cuatro presuntos eventos de contaminación cruzada de laboratorio ocurridos entre 2002 y 2003 en el Hospital II empleando un sistema totalmente automatizado de cultivo en medio líquido. Las barras horizontales al pie agrupan aislamientos del mismo evento. Los números corresponden a los números de aislamientos de la Tabla 4. Las flechas señalan los perfiles genéticos de las cepas causantes de contaminación. Los círculos indican los cultivos contaminados. El perfil 25 (contaminado) corresponde al control de tratamiento de un paciente con evolución favorable y falso cultivo positivo; el perfil 26* corresponde al aislamiento original del mismo paciente (cruz recuadrada). Las demás cruces recuadradas en calles 29, 30 y 31 indican cultivos sospechados de contaminación en los que se descartó la sospecha mediante genotipificación. Imágenes digitalizadas y analizadas mediante el *software* BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Belgium).

Hospital III

Se trata de un hospital general de agudos ubicado en la zona suburbana de Buenos Aires. En el período de estudio, el laboratorio procesaba aproximadamente 1500 especímenes anuales para cultivo de micobacterias mediante el método convencional de cultivo en medio sólido (Lowenstein-Jensen) seguido de identificación bioquímica y se aislaba *M. tuberculosis* en alrededor del 11% de los cultivos.

El primer episodio fue un hallazgo retrospectivo dentro del marco de un estudio de población en el cual los aislamientos de todos los casos de tuberculosis ocurridos durante 1997 fueron sometidos a genotipificación. Durante el análisis de los resultados

de 99 pacientes se observó que el cluster de mayor tamaño comprendía 12 aislamientos de nueve pacientes con idéntico RFLP IS6110 y sin vínculo epidemiológico conocido entre sí. La revisión de los registros médicos y de laboratorio puso en evidencia un episodio solapado de contaminación cruzada de laboratorio que se extendió durante 10 días calendarios (Tabla 5). Se observó que durante abril, el mes en el que ocurrió este episodio, la recuperación de *M. tuberculosis* fue claramente superior al promedio del año (19.8%, 22/111 vs. 11.5%, 168/1457 Figura 7).

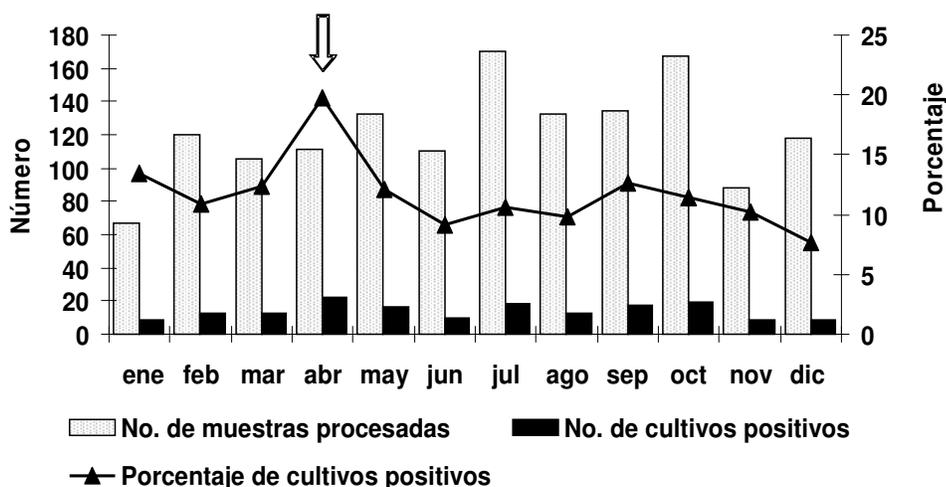


Figura 7. Número de muestras procesadas durante 1997 en el Hospital III, número y porcentaje de cultivos positivos para *M. tuberculosis*

En este confuso episodio, los cultivos positivos aparecían intercalados con cultivos negativos. Los cultivos que resultaron contaminados no desarrollaron a partir de todas las muestras procesadas en ese período sino sólo de las que habían sido sometidas al método de Petroff (para la decontaminación de gérmenes comunes) y aparecieron falsos cultivos positivos sólo en tres de las cinco jornadas laborales del período de 10 días que duró la contaminación (Tabla 5). Todos los cultivos resultaron ser sensibles a las drogas antituberculosis de primera línea.

El análisis de los registros de laboratorio puso en evidencia que la muestra que desencadenó el episodio pertenecía a un paciente con tuberculosis diseminada asociada a SIDA. Las historias clínicas de los otros ocho pacientes involucrados en el episodio revelaron que sólo uno tenía diagnóstico firme de tuberculosis por cultivo previo; la evolución de otros cinco pacientes reveló el verdadero diagnóstico, que era diferente de tuberculosis. De los dos pacientes restantes, uno no volvió a la consulta y el otro tenía fuerte sospecha clínica de tuberculosis y recibió tratamiento (Tabla 5).

El segundo evento ocurrió en 2002 y fue sospechado por la bacterióloga. Involucró los aislamientos de dos pacientes, ambos con idéntico perfil de sensibilidad a drogas

(resistentes a isoniazida, rifampicina, estreptomina, etambutol, pirazinamida y kanamicina) cuyas muestras, una positiva y la otra negativa al examen microscópico directo, habían sido procesadas el mismo día. Los patrones idénticos de RFLP, spoligotyping y DRE-PCR confirmaron la contaminación que en este caso fue causada por una notoria cepa de brote transmitida en los hospitales de Buenos Aires y sus alrededores (Ritacco 1996, Poggio 1997). Los tres métodos coincidieron en confirmar la contaminación cruzada de laboratorio (Figura 8).

Tabla 5. Registro de laboratorio e información clínica relacionada con un evento de contaminación cruzada ocurrido en el Hospital I en 1997.

Fecha	Pacien- te	Registro de laboratorio					Historia clínica		
		Muestra		Examen micro- scópico directo	No. de colonias en cultivo		Cultivo previo o posterior	Previa	Evolución o diagnóstico final
		Nº	Material		Previo Petroff	Sin decontaminar			
abr-16	A	1	Ganglio linfático	++	>100	>100	Nd	Tuberculosis SIDA	Tuberculosis diseminada
		2	Lavado bronco- alveolar	-	<5	nd			
	B	3	Lavado bronco- alveolar	-	<5	nd	Nd	Pneumonia	Sepsis por <i>Staphylococcus aureus</i>
		-	Biopsia pulmón	-	0	0			
	C	4	Líquido pleural	-	<5	0			
		-	Biopsia pleural	-	0	0	Nd	Pleuresía, ascitis	Neoplasia
	D	5	Espuito	-	5	nd	Pos*	Tuberculosis- SIDA	Tuberculosis
	E	6	Biopsia de tejido vascular	-	5	0	Nd	Infección prótesis vascular	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
	F	7	Espuito	-	<5	Nd	Nd	Sospecha de tuberculosis	Tratamiento de tuberculosis
	G	8	Espuito	-	<5	Nd			
	9	Espuito	-	<5	Nd			Contacto de caso de tuberculosis	No volvió a la consulta
	H	10	Líquido pleural	-	<5	0			
11	Biopsia pleural	-	<5	0		Nd	Exudado por insuficiencia cardíaca	Remisión con tratamiento sintomático	
I	12	Orina	-	<5	Nd	Nd	Infección urinaria recurrente	Pielonefritis	

* El aislamiento previo de esta paciente no estuvo disponible para genotipificación.

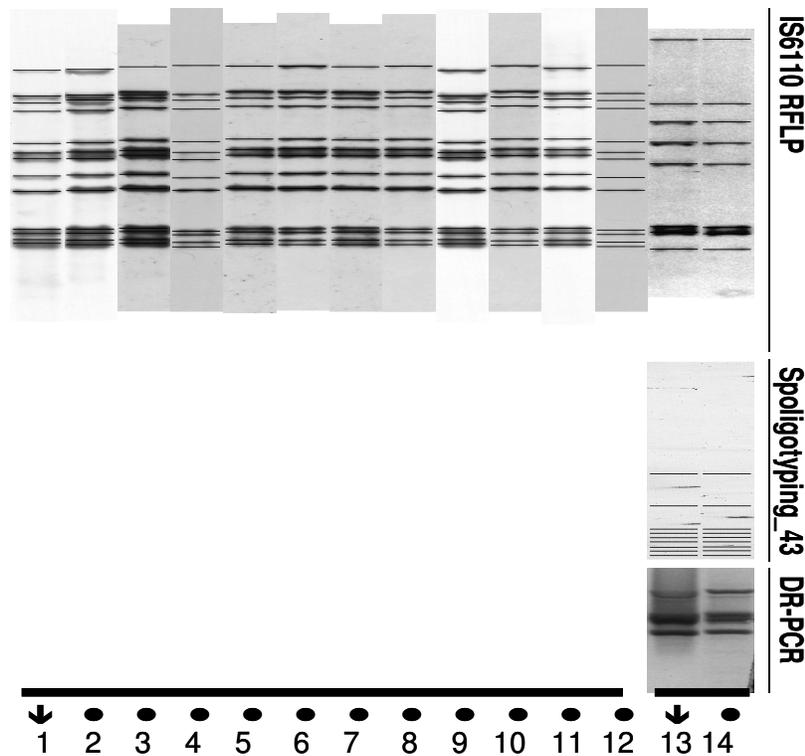


Figura 8. Patrones RFLP IS6110, spoligotipos y patrones DRE-PCR de 14 aislamientos involucrados en dos eventos de contaminación cruzada de laboratorio ocurridos en el hospital III en 1997 y 2002, respectivamente. Los cultivos fueron realizados en medio sólido. Las barras horizontales al pie agrupan los aislamientos de cada evento. Los números corresponden a los números de aislamientos descritos en la [Tabla 5](#) y el texto. Las flechas señalan los perfiles genéticos de las cepas causantes de contaminación. Los círculos indican los cultivos contaminados. Imágenes digitalizadas y analizadas mediante el software BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Belgium).

Hospital IV

Se trata de un hospital general de la ciudad de Buenos Aires cuyo laboratorio procesa alrededor de 400 muestras anuales para el cultivo de micobacterias, la mayoría de ellas de pacientes con SIDA. En el período de estudio las muestras eran cultivadas mediante el sistema BACTEC 460 (Becton Dickinson, Sparks, MD).

Los dos eventos involucraron aislamientos multirresistentes. En ambos, la muestra causante de la contaminación era positiva al examen microscópico directo, los patrones genéticos confirmaron la sospecha de contaminación y los perfiles de resistencia fueron concordantes con los genotipos. El primero evento fue un hallazgo en el transcurso de un estudio de vigilancia de la multirresistencia y los dos aislamientos involucrados eran resistentes a isoniazida, rifampicina y estreptomina ([Figura 9](#), calles 1 y 2). El segundo evento fue sospechado por la bacterióloga del hospital y enviado a nuestro laboratorio para su confirmación. Los tres aislamientos del segundo evento eran monorresistentes a rifampicina ([Figura 9](#), calles 3 a 5).

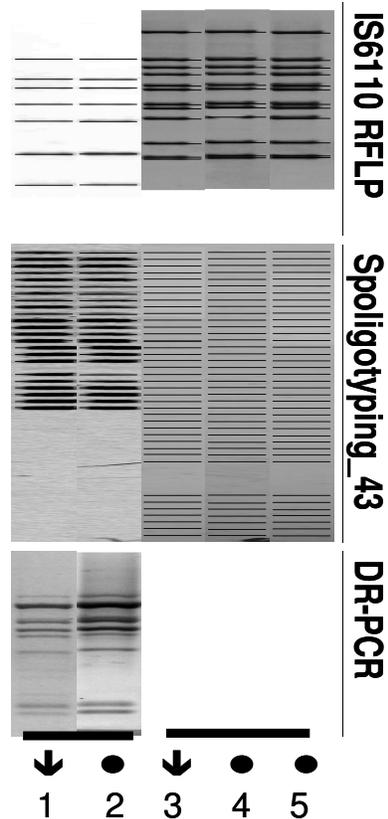


Figura 9. Perfiles de RFLP IS6110, spoligotyping y DRE-PCR disponibles de 5 aislamientos involucrados en dos eventos de contaminación cruzada de laboratorio ocurridos en 1998 y 2000 en el Hospital IV. El hospital empleaba el sistema radiométrico de cultivo. Las barras horizontales al pie agrupan los aislamientos de cada evento. Las flechas señalan los perfiles genéticos de las cepas causantes de contaminación. Los círculos indican los cultivos contaminados. Imágenes digitalizadas y analizadas mediante el *software* BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Belgium).

Hospital V

Se trata de un hospital dedicado a rehabilitación respiratoria. El laboratorio destinado al diagnóstico de tuberculosis procesa una cantidad moderada de muestras y el cultivo se realiza mediante el método convencional en medio sólido de Lowenstein-Jensen.

La sospecha de contaminación surgió en el laboratorio de referencia al comparar perfiles de sensibilidad a drogas de dos muestras derivadas simultáneamente de un centro con relativamente baja carga de trabajo. La cepa contaminante correspondía a un paciente HIV negativo con tuberculosis pulmonar de larga data que había sido atendido con anterioridad en el hospital adonde se generó el mayor brote hospitalario de tuberculosis multirresistente del país (Ritacco 2007). La muestra de esputo era positiva (+++) al examen microscópico directo y el cultivo era resistente a todas las drogas de primera línea. Un aislamiento anterior del mismo paciente obtenido en aquel hospital había sido sometido a genotipificación con anterioridad y su patrón genético, que estaba

disponible en nuestra base de datos coincidía con el de la cepa de brote. La muestra presuntamente contaminada era negativa al examen microscópico directo. El error fue confirmado por la identidad de los patrones genéticos (Figura 10).

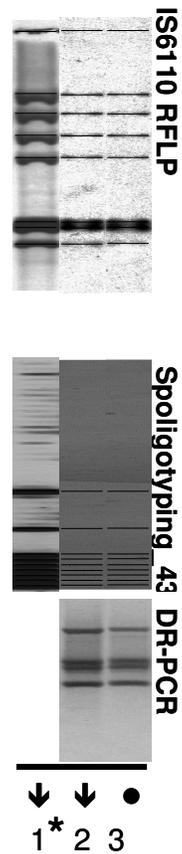


Figura 10. Perfiles de RFLP IS6110, spoligotyping y DRE-PCR disponibles de tres aislamientos involucrados en un evento de contaminación cruzada de laboratorio ocurrido en el año 2000 en el Hospital V. El laboratorio empleaba el sistema convencional de cultivo en medio sólido. Las flechas señalan el perfil genético del aislamiento multirresistente causante de la contaminación (calle 2) y un aislamiento anterior del mismo paciente, obtenido en otro hospital (calle 1*). El círculo indica el cultivo contaminado. Imágenes digitalizadas y analizadas mediante el *software* BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Belgium).

Hospital VI

Se trata de un hospital general de agudos ubicado en Ciudad de Buenos Aires en el que funciona uno de los cuatro laboratorios de referencia de la red de tuberculosis de la ciudad. El laboratorio procesa una gran cantidad de muestras para el cultivo de micobacterias. En el período de estudio este laboratorio utilizaba el sistema de cultivo BACTEC 460 (Becton Dickinson, Sparks, MD).

Este laboratorio envió a nuestro laboratorio de referencia cinco aislamientos correspondientes a dos presuntos episodios de contaminación cruzada de muestras ocurridos en 2000 y 2001, respectivamente. En los dos casos, la sospecha se originó a raíz de la observación de cultivos positivos con menos de cinco colonias (Figura 11 calles 2, 4 y 5) desarrollados a partir de muestras negativas al examen microscópico directo, las cuales habían sido procesadas a continuación de dos muestras con alta carga bacilar y desarrollo abundante (Figura 11 calles 1 y 3), respectivamente. Todos los pacientes involucrados, excepto uno del cual no se obtuvieron datos, eran HIV positivos. La muestra que originó la contaminación en el primer evento era una biopsia de ganglio positiva (+++) al examen microscópico directo y pertenecía a un paciente con SIDA y tuberculosis multirresistente diseminada. Los patrones RFLP idénticos y los perfiles de sensibilidad concordantes (resistencia a isoniazida y rifampicina) confirmaron la sospecha de contaminación. En cambio, el segundo evento fue descartado porque los patrones RFLP y los perfiles de sensibilidad de los tres aislamientos resultaron discordantes.

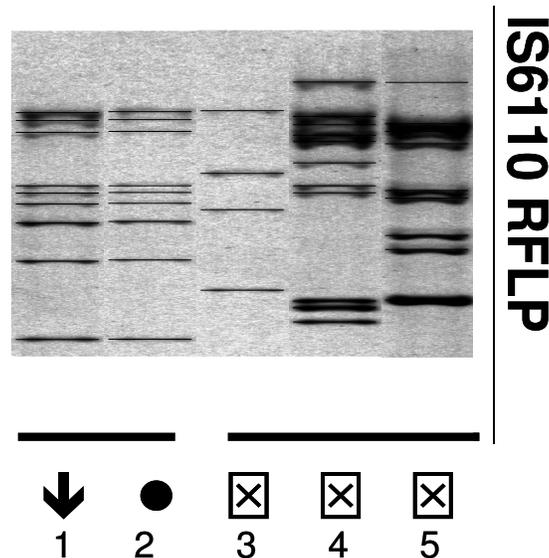


Figura 11. Perfiles de RFLP IS6110 de cinco aislamientos involucrados en dos presuntos eventos de contaminación cruzada de laboratorio ocurrido en el año 2000 y 2001 en el Hospital VI. El laboratorio empleaba el sistema radiométrico de cultivo. Las barras horizontales al pie agrupan los aislamientos de cada evento. La flecha señalan el perfil genético del aislamiento causante de la contaminación en el primer evento (calle 1) y el círculo indica el cultivo contaminado. El segundo evento fue descartado en base a diferentes genotipos (cuadrados cruzados) y perfiles de sensibilidad. Imágenes digitalizadas y analizadas mediante el *software* BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Belgium).

Hospital VII

Se trata de un hospital interzonal ubicado en La Plata que alberga al laboratorio de referencia de tuberculosis para la provincia de Buenos Aires. El laboratorio procesa alrededor de 1500 muestras por año para el diagnóstico de tuberculosis, tanto de pacientes propios como derivadas de cárceles y otros hospitales de la provincia. Durante el período de estudio las muestras fueron cultivadas mediante el método convencional en medio Lowenstein-Jensen.

Se analizaron tres presuntos episodios a solicitud del mismo laboratorio. Los episodios ocurrieron en el lapso de un mes entre fines de 2000 y comienzos de 2001, los que involucraron un total de 15 muestras. Las muestras con examen directo positivo desarrollaron más de 100 colonias, mientras que en las muestras negativas al examen directo desarrollaron menos de cinco colonias (Figura 12).

Se descartó la posibilidad de contaminación cruzada en el primer episodio porque tanto los patrones de RFLP como los spoligotipos fueron diferentes (Figura 12). Además, el cultivo de calle 2 era multirresistente y los otros eran sensibles a todas las drogas de primera línea. Los otros dos episodios consistieron en dos grupos de aislamientos pansensibles y cada uno incluyó genotipos idénticos, lo que es altamente sugestivo de contaminación cruzada. Dado que no se obtuvo información clínico-epidemiológica de los casos que descartara contacto o transmisión institucional, estos dos eventos no pudieron ser confirmados categóricamente en nuestros registros.

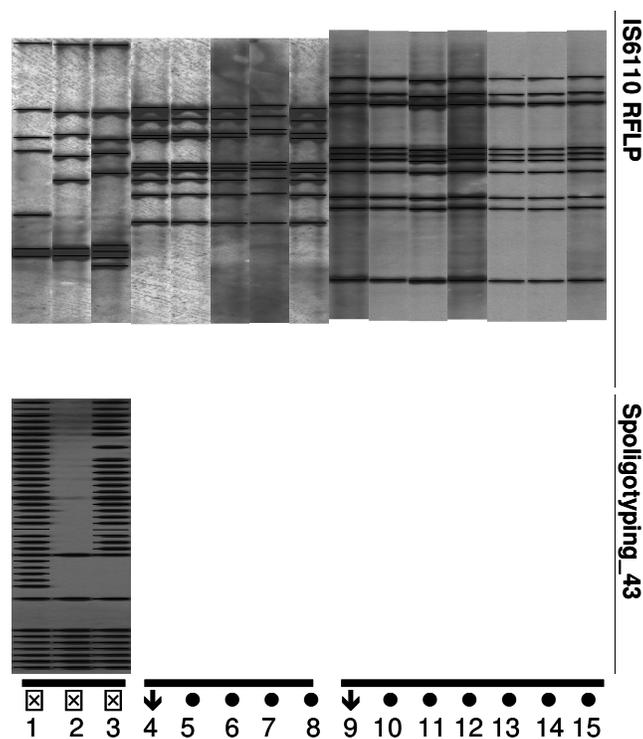


Figura 12. Perfiles de RFLP IS6110 y spoligotyping disponibles de 15 aislamientos involucrados en tres presuntos eventos de contaminación cruzada de laboratorio ocurridos en 2000 y 2001 en el Hospital VII. El laboratorio empleaba el sistema convencional de cultivo en medio sólido. Las barras horizontales al pie agrupan los aislamientos de cada evento. El primer evento fue descartado en base a diferentes genotipos y perfiles de sensibilidad. Las flechas señalan los perfiles genéticos de los aislamientos causantes de la contaminación en el segundo y tercer eventos (calles 4 y 9, respectivamente) y los círculos indican los cultivos contaminados. Imágenes digitalizadas y analizadas mediante el *software* BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Belgium).

Hospital VIII

Se trata de un hospital general de agudos ubicado en Ciudad de Buenos Aires en el que funciona uno de los cuatro laboratorios de referencia de la red de tuberculosis de la ciudad. El laboratorio procesa una gran cantidad de muestras para el cultivo de micobacterias y además recibe aislamientos derivados de otros hospitales de la ciudad para tipificación de especie y/o pruebas de sensibilidad a drogas. En el período de estudio este laboratorio utilizaba el sistema de cultivo BACTEC 460 (Becton Dickinson, Sparks, MD).

Se analizaron dos episodios ocurridos en 2001 que involucraron el análisis de seis muestras (incluida una muestra previa de uno de los pacientes). La contaminación de laboratorio se confirmó en los dos episodios. Las muestras que causaron la contaminación eran positivas (+++) al examen microscópico directo y las contaminadas eran negativas y en ambos casos habían sido procesadas inmediatamente después de las muestras con alta carga bacilar. Todos los aislamientos de los dos episodios fueron sensibles a drogas de primera línea. Nuestra base de datos en el laboratorio de referencia contaba con el genotipo de un aislamiento anterior de uno de los pacientes involucrados (calle 3*), el que mostró claramente un perfil genético diferente al del falso cultivo positivo (calle 2) obtenido en el evento de contaminación cruzada de laboratorio (Figura 13).

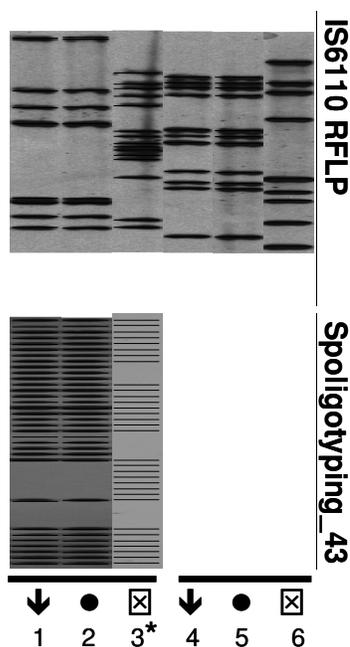


Figura 13. Perfiles de RFLP IS6110 de seis aislamientos involucrados en dos presuntos eventos de contaminación cruzada de laboratorio ocurridos en 2000 y 2001 en el Hospital VIII. El laboratorio empleaba el sistema radiométrico de cultivo. Las barras horizontales al pie agrupan los aislamientos de cada evento. Ambos eventos fueron confirmados por genotipificación. Las flechas señalan los perfiles genéticos de los aislamientos causantes de la contaminación. Los círculos indican los cultivos contaminados. La calle 3* representa el genotipo original del paciente con falso cultivo positivo en calle 2. La calle 6 representa un aislamiento sospechado de contaminación en el segundo evento pero con sospecha descartada por RFLP. Imágenes digitalizadas y analizadas mediante el *software* BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Belgium).

Hospital IX

Se trata de un hospital de referencia de enfermedades infecciosas ubicado en Capital Federal. El laboratorio de micobacterias este hospital es uno de los cuatro nodos de referencia de la red de tuberculosis de la ciudad y procesa más de 1000 muestras anuales para cultivo de micobacterias.

A solicitud de la bacterióloga del laboratorio, se analizó un episodio sospechado de contaminación cruzada de muestras con un total de siete aislamientos. Las muestras fueron procesadas mediante el sistema de cultivo BACTEC 460 (Becton Dickinson, Sparks, MD). Sólo una muestra resultó con examen directo positivo (++). En nuestro laboratorio no se recibieron datos sobre la sensibilidad de las cepas involucradas, de los registros de laboratorio ni sobre las características clínico-epidemiológicas de los pacientes. Los patrones RFLP idénticos en los siete aislamientos permitieron reforzar categóricamente la sospecha de la bacterióloga responsable del envío de las muestras (Figura 14).

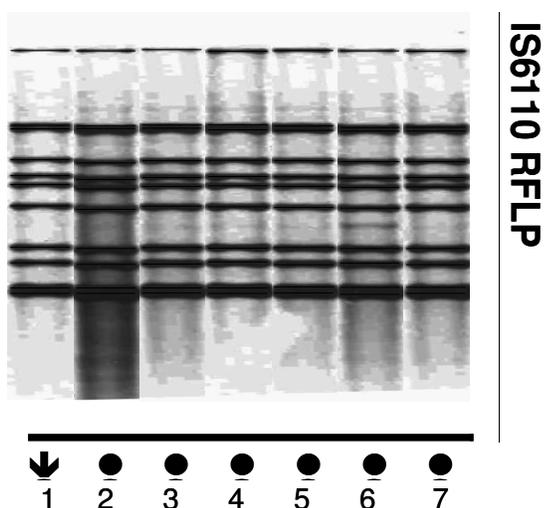


Figura 14. Perfiles de RFLP IS6110 de siete aislamientos involucrados en un presunto evento de contaminación cruzada de laboratorio ocurridos en 1999 en el Hospital IX. El laboratorio empleaba el sistema radiométrico de cultivo. El evento fue virtualmente confirmado por genotipificación. La flecha señala el perfil genético del aislamiento positivo al examen microscópico directo que causó la contaminación. Los círculos indican los cultivos contaminados. Imágenes digitalizadas y analizadas mediante el *software* BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Belgium).

Hospital X

Se trata de un hospital general ubicado en una provincia del interior del país. El laboratorio procesa una cantidad moderada de muestras para el cultivo de micobacterias mediante cultivo convencional en medio sólido de Lowenstein-Jensen.

El laboratorio de referencia sospechó contaminación cruzada de muestras y solicitó todos los aislamientos obtenidos durante un período de un mes (abril 2003). Todos los aislamientos fueron sensibles a las drogas anti-tuberculosis de primera línea. El paciente cuya muestra fue la contaminante trabajaba en el quirófano del hospital y tenía historia de tuberculosis crónica con reiterados abandonos de tratamiento. Su muestra fue la única positiva al examen microscópico directo.

Los aislamientos fueron analizados mediante RFLP, spoligotyping y DRE-PCR. Se observó el mismo patrón de bandas en las muestras estudiadas por las tres técnicas utilizadas (Figura 15). Nótese que los patrones DRE-PCR tienen ciertas variaciones entre sí dentro de un perfil global semejante.

En nuestro laboratorio no se recibieron ulteriores datos sobre las características clínico-epidemiológicas ni la evolución de los pacientes. Este resultó ser el episodio más grande registrado en el Laboratorio de Referencia.

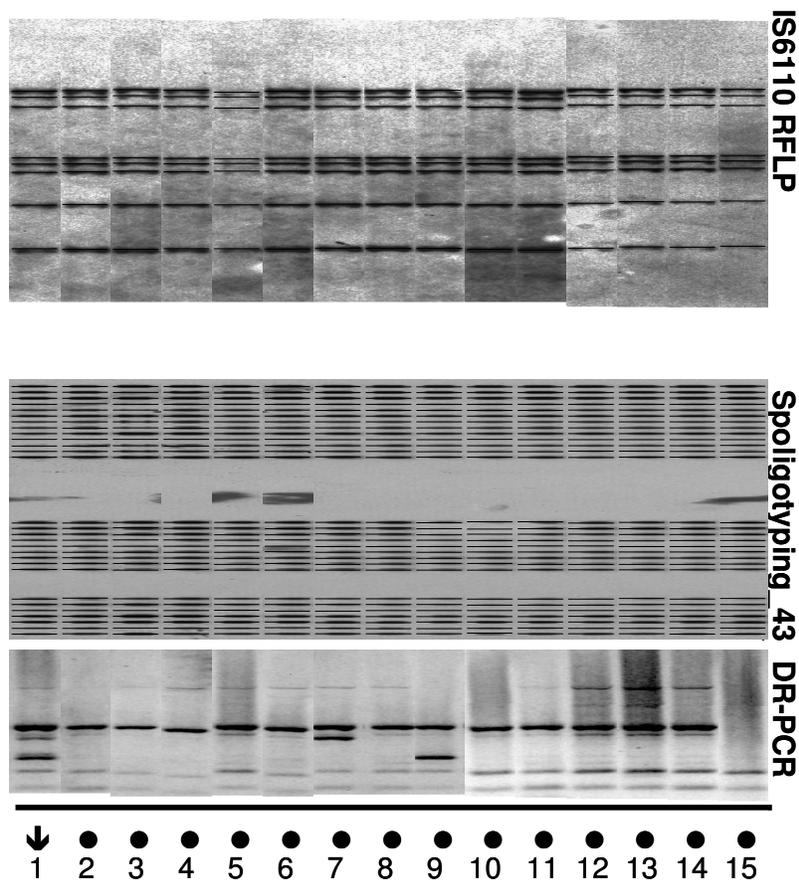


Figura 15. Perfiles de RFLP IS6110 de 15 aislamientos involucrados en un presunto evento de contaminación cruzada de laboratorio ocurridos en abril de 2003 en el Hospital X. El laboratorio empleaba el sistema convencional de cultivo. El evento fue virtualmente confirmado por genotipificación. La flecha señala el perfil genético del aislamiento obtenido de la muestra positiva al examen microscópico directo que causó la contaminación. Los círculos indican los cultivos contaminados. Imágenes digitalizadas y analizadas mediante el *software* BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Belgium).

DISCUSIÓN

El tema de la contaminación cruzada en el laboratorio de tuberculosis se puso de relieve a nivel global a raíz del enorme auge que tuvieron los métodos de genotipificación intra-especie de *M. tuberculosis* en la década de los noventa y a su aplicación a estudios de epidemiología molecular (Bhattacharya 1998, Martínez 2006). Aún cuando por sí sola es insuficiente, la genotipificación es la única herramienta disponible en el laboratorio de micobacterias para confirmar fehacientemente un episodio sospechado de contaminación cruzada. De hecho, con frecuencia son los estudios sistemáticos de genotipificación con fines epidemiológicos los primeros en poner en evidencia eventos de contaminación que habían pasado desapercibidos tanto en el laboratorio como en la clínica (Wurtz 1998, Cronin 1998, Bearman 2002).

Para detectar episodios de contaminación cruzada de muestras en los laboratorios de nuestra Red Nacional de Tuberculosis es preciso, en primer lugar, sospecharlos. Para confirmarlos es necesario evaluar en forma conjunta la información provista por la historia clínica de los pacientes involucrados (tanto anterior a la toma de la muestra como su evolución posterior), la investigación de foco y los resultados de la genotipificación. Si alguna de ellas no está disponible, el proceso de identificación se complica y el evento puede quedar sin resolver.

La mayor parte de los eventos descritos en este estudio fue provista por laboratorios de la Ciudad de Buenos Aires y sus alrededores. Esto no es de extrañar, puesto que alrededor de la mitad de los casos de tuberculosis del país son diagnosticados y asistidos en esa área. Además, en esa área también se concentran los hospitales de mayor caudal de atención de pacientes y de mayor carga de trabajo en el laboratorio de tuberculosis. Por cierto, los bacteriólogos a cargo de esos laboratorios se encuentran entre los más idóneos y alertas de la Red Nacional de Tuberculosis. De hecho, en la mayoría de los casos fueron los mismos profesionales a cargo de los laboratorios de la red quienes en primer lugar sospecharon el error y elevaron la inquietud al laboratorio de referencia. Es probable que el fenómeno ocurra con similar frecuencia en otros laboratorios de la Red Nacional de Tuberculosis y que pase desapercibido por desconocimiento del problema, sobrecarga de trabajo o insuficiente motivación. La comunicación fluida entre el laboratorio de origen y el de referencia es fundamental para incentivar la búsqueda de estos eventos y resolverlos (de Boer 2002, Burman 1997, Fischl 1992, Glyn 2004, Gutierrez 1998, Moore 2006, Ruddy 2002, Wurtz 1996, Yan 2005, Martínez 2006).

En todos los casos de nuestro estudio en los que se confirmó la contaminación se pudo identificar el caso fuente de la contaminación que era positivo al examen microscópico directo. Los cultivos contaminados eran negativos a este examen. En consecuencia, todos los cultivos causantes de la contaminación tuvieron desarrollo abundante mientras que los cultivos contaminados desarrollaron tardíamente y sólo excepcionalmente con más de cinco colonias. Se ha propuesto que un cultivo con tan escaso desarrollo debe ser sistemáticamente considerado sospechoso de contaminación (Small 1993). Este signo de alarma bien puede ser válido en un laboratorio general pero no en un hospital de pediatría como el Hospital II de nuestro estudio. Por cierto, la vasta mayoría de las muestras de casos pediátricos suelen ser negativas o desarrollar muy pocas colonias en el cultivo y en estos casos la diferencia con un falso positivo puede ser muy sutil.

En los eventos confirmados en este estudio el error pudo haberse producido en cualquiera de los pasos que conforman el procesamiento bacteriológico de una muestra

clínica, desde la manipulación de la muestra fresca hasta las pruebas de identificación (Bauer 1997, van Duin 1998). Se atribuye un riesgo mayor de falsos cultivos positivos al uso de medios líquidos. Ciertamente, estos medios muy enriquecidos ofrecen óptimas condiciones de crecimiento a los bacilos, aún a partir de un inóculo muy pequeño y/o después de sufrir estrés en el transporte, en el ambiente del laboratorio o durante el procesamiento de la muestra (Tortoli 1999, Gascoyne-Binzi 2001).

De los 10 laboratorios que enviaron aislamientos, cuatro utilizaban el sistema de cultivo BACTEC 460 (Becton Dickinson, Sparks, MD). Este sistema de detección radiométrica en medio líquido tiene un factor agregado de riesgo de contaminación cruzada ya que, para la lectura del crecimiento, toma una muestra de la atmósfera del frasco de cultivo mediante una aguja que perfora uno tras otro los tapones de goma. Una sutil falla en el funcionamiento del incinerador de la aguja puede desencadenar el traslado de bacilos viables de un frasco de cultivo positivo a los siguientes (Alonso 2007).

El laboratorio con mayor número de episodios en nuestro estudio fue el de un hospital pediátrico que originalmente utilizaba el sistema radiométrico de cultivo (Hospital II). En el año 2000 se detectó y corrigió un desperfecto en el equipo de incineración de la aguja y el problema pareció ser superado pues no se sospechó ningún evento en el transcurso de 2001. Debido al riesgo biológico de la manipulación de reactivos radioactivos, el sistema radiométrico fue cayendo en desuso y en 2002 este hospital reemplazó el sistema radiométrico por el sistema automatizado fluorométrico MBbact (ahora denominado BacT Alert 3D, BioMérieux). Desde entonces se observó una disminución notable en los eventos sospechosos de contaminación. Sin embargo, se produjeron nuevos episodios, aunque en menor escala, cuando se relajaron las rigurosas medidas que habían sido adoptadas para minimizar su ocurrencia. A pesar de que los casos pediátricos representan, como se dijo más arriba, un obstáculo agregado para la identificación de contaminación cruzada de muestras, el alerta de la sagaz bacterióloga de este hospital permitió identificar precozmente todos los episodios sospechosos y evitar así el tratamiento innecesario de los niños involucrados (Casimir 2004).

Los episodios de contaminación cruzada más prolongados se registraron en dos hospitales que empleaban el método convencional de cultivo en medio sólido (Hospitales III y X). En estos, y también en el Hospital I, se apuntó con cierto grado de certeza al procedimiento de decontaminación de muestras clínicas de origen no estéril como el causante de falsos cultivos positivos. Ciertamente, uno de los factores que contribuyen a la contaminación cruzada es la notable capacidad de *M. tuberculosis* de sobrevivir en condiciones adversas. Los bacilos pueden permanecer viables durante períodos prolongados en equipos o soluciones de trabajo contaminadas (Burman 2000, Ramos 1999) y hasta en material biológico sometido a fijación por calor o formol (Kantor 1999). Esto es particularmente cierto para los reactivos y viales empleados en el procedimiento de decontaminación de especímenes clínicos que provienen de sitios no estériles, un paso obligado para evitar el desarrollo de microorganismos ambientales o de la flora normal de la muestra.

Una información de gran utilidad fue la provista por los perfiles genéticos de aislamientos anteriores que habían sido guardados en nuestra base de datos. Estos permitieron reforzar el resultado obtenido en algunos casos con alta sospecha (Hospital I episodio 3) y especialmente en aquellos en los que nos se contaba con suficiente información clínico-epidemiológica (Hospital V y Hospital VIII). En los eventos en los que se adjuntó toda la información de laboratorio y clínico-epidemiológicos necesaria, el resultado pudo obtenerse con mayor rapidez y precisión.

Es importante destacar los motivos por los que los materiales fueron remitidos al Laboratorio de Referencia. En la mayoría de los casos, los grupos de aislamientos sospechosos fueron enviados espontáneamente desde el laboratorio de origen para confirmar la sospecha. En otros casos las muestras fueron enviadas con otra finalidad (vigilancia de resistencia a drogas, transmisión hospitalaria, estudio de población) y la posibilidad de contaminación se planteó desde nuestro laboratorio (Hospital VII). En uno de los laboratorios (Hospital I), en el curso de un estudio de población, la bacterióloga sospechó y confirmó precozmente tres episodios de contaminación cruzada ocurridos entre 1996 y 1998, lo que evitó el tratamiento innecesario de pacientes con falso diagnóstico de tuberculosis. A tal fin, la comunicación fluida del laboratorio con el equipo médico fue un factor determinante. Estos episodios fueron los primeros en ser detectados en la Argentina. La tasa de contaminación cruzada en ese laboratorio resultó ser 2.7% de los cultivos positivos procesados anualmente (Reniero 1999).

El solapado episodio que se detectó en el Hospital III fue un hallazgo casi fortuito en el marco de un estudio de transmisión nosocomial de tuberculosis. El análisis retrospectivo de este evento puso en evidencia la importancia de revisar los registros diarios de protocolo del laboratorio y también los registros periódicos de recuperación de *M. tuberculosis*. Un aumento inusitado en el porcentaje de cultivos positivos durante el mes en el que ocurrió este evento pudo haber advertido más precozmente al personal del laboratorio sobre esta contaminación prolongada.

Uno de los hospitales reconoció haber tenido una sobrecarga de trabajo en el período en cual ocurrió la contaminación (Hospital III). La probabilidad de que exista contaminación cruzada de muestras es mayor cuando existe sobrecarga de trabajo y se procesan lotes de muchas muestras por jornada. Por otro lado, cuando se procesa un exiguo número también existe riesgo de contaminación por falta de práctica, como sucedió en el Hospital I. Un laboratorio (Hospital X) admitió haber reemplazado personal en el período de estudio. La incorporación de nuevo personal, más aún si no tiene entrenamiento adecuado, también ha sido destacada como un factor de riesgo (Bauer 1997, Burman 1997, de Boer 2002, Ramos 1999, Wurtz 1996).

En cuanto a las técnicas utilizadas, se comprobó una vez más el alto poder de discriminación del RFLP IS6110, el que no se alcanzó con las otras técnicas. Esto resultó particularmente evidente en el evento 6 (Hospital II) donde se observó una diferencia mínima (banda extra débil) entre el patrón del aislamiento contaminante y los de los dos aislamientos contaminados (Tabla 4, Figura 5, calles 6 a 8). Este hallazgo puede ser atribuido a la incipiente aparición de un clon mutante en la población de *M. tuberculosis* del caso verdadero.

Este método, a pesar de su gran laboriosidad y altos costos para nuestro laboratorio, resulta hasta el día de hoy irremplazable para confirmar un episodio de contaminación, mostrando perfectamente y con total claridad el perfil de bandas obtenido de cada cepa. La limitación de esta técnica se encuentra en las cepas que presentan muy pocas copias de IS6110 en su genoma. En dicho caso, otras técnicas que utilicen otro marcador genético superan el poder de discriminación del RFLP. Sin embargo, en nuestro estudio esta situación no afectó el análisis, probablemente porque las cepas con bajo número de copias de IS6110 son infrecuentes en la Argentina.

El spoligotyping es rápido y reproducible, no requiere ADN íntegro ni en grandes cantidades y puede realizarse a partir de la muestra clínica, de un medio de cultivo líquido o de una colonia aislada de medio sólido. Es útil para el diagnóstico clínico y

para estudios epidemiológicos al mismo tiempo. Comparado con el RFLP tiene un poder de discriminación menor y por lo tanto produce sobreestimación de los clusters (Gori 2005). En nuestro caso, permitió descartar con certeza una contaminación cruzada cuando los spoligotipos fueron diferentes pero no confirmar una contaminación cuando los spoligotipos fueron idénticos.

Se utilizó DRE-PCR para analizar algunos de los episodios. Esta técnica es interesante debido a que es rápida, sencilla, tiene bajo costo, no necesita ADN demasiado íntegro ni en gran cantidad. Sin embargo, en el transcurso de nuestro estudio comprobamos que los resultados no son totalmente reproducibles inter-experimento, aún en el mismo laboratorio. Además, el patrón de bandas no es muy nítido y la presencia de algunas bandas débiles es algo errática o ambigua. Por ese motivo en nuestro laboratorio resulta útil si sólo se aspira a comparar perfiles de bandas relevantes en un mismo experimento. Como es un método de baja complejidad, accesible en nuestro medio y se completa en sólo ocho horas, resulta útil como prueba tamiz, pero sus resultados deben ser confirmados por otro método de genotipificación (Ritacco 2002, Varela 2005).

Al tomar conocimiento de los resultados de este estudio, los laboratorios involucrados se abocaron a minimizar el riesgo de contaminación cruzada, extremando medidas de control como asegurar el correcto flujo de aire en la cabina de seguridad biológica y en el laboratorio, fraccionar en alícuotas pequeñas los reactivos utilizados en el proceso de decontaminación, usar pipetas individuales para cada muestra, evitar formación de aerosoles, procesar menos de 12 muestras por sesión de trabajo, etc.

Este trabajo tiene varias limitaciones. En principio, no se trata de un estudio prospectivo, homogéneo ni sistemático. Algunos de los episodios descritos habían sido documentados con anterioridad y se los recapitula aquí con el objeto de proveer una visión integral, descriptiva del panorama de la contaminación cruzada en los laboratorios de la Red Nacional de Tuberculosis. Si bien todos los aislamientos fueron investigados por RFLP, el método de máximo poder de discriminación, no todos pudieron ser investigados por los tres métodos disponibles en nuestro laboratorio. Esto se debió en parte a la inclusión de eventos recopilados de estudios anteriores y en parte a limitaciones en la disponibilidad de muestras y reactivos. La información proporcionada por los laboratorios participantes no fue exhaustiva: en un solo caso (Hospital II) se contó con los registros diarios del laboratorio. Por su parte, la información clínico-epidemiológica en algunos casos fue francamente deficiente y en otros, nula. En su mayoría, los eventos fueron analizados retrospectivamente, meses después de su ocurrencia y en ningún caso se pudo demostrar fehacientemente la causa de la contaminación porque los materiales y/o reactivos potencialmente contaminados ya habían sido descartados.

A pesar de sus limitaciones, este estudio permitió reconocer la existencia de contaminación cruzada en laboratorios de la Red Nacional de Tuberculosis, contribuir a su comprensión y difusión, tener una idea aproximada de su magnitud, identificar los más probables procedimientos de riesgo en nuestro medio y alertar a los miembros de la red de eventualidad de este error de laboratorio, de los mecanismos aconsejables para realizar su vigilancia y de las herramientas disponibles en la red para detectarla.

En suma, el Servicio de Micobacterias del Instituto Malbrán brinda a los laboratorios de la Red Nacional de Tuberculosis poderosas herramientas de genotipificación para la confirmación de presuntos errores de laboratorio y la vigilancia de la calidad del diagnóstico de tuberculosis mediante cultivo.

CONCLUSIONES

La contaminación cruzada de muestras no es un fenómeno inusitado en los laboratorios de la Red Nacional de Tuberculosis, ya que ha sido detectada en todos los laboratorios en los que se la sospechó y/o se realizó su vigilancia.

Este error de laboratorio ocurrió en laboratorio con alta, mediana y baja carga de trabajo, en manos de personal altamente calificado, y empleando ya sea métodos convencionales de cultivo en medio sólido y los más modernos sistemas automatizados comerciales.

El procedimiento de riesgo más frecuente de este error de laboratorio en laboratorios que empleaban el sistema radiométrico de cultivo fue, durante el período de estudio, un defecto de funcionamiento en el dispositivo de incineración de la aguja que penetra en los frascos de cultivo para tomar muestra de CO₂. Este sistema radiométrico actualmente ha sido reemplazado casi completamente por sistemas automatizados no invasivos de detección fluorométrica.

El procedimiento bacteriológico más vulnerable a este error de laboratorio continúa siendo la decontaminación de las muestras, que es un paso obligado en muestras no estériles como las de origen respiratorio, independientemente del sistema de cultivo empleado.

Los tres métodos genotípicos empleados para la confirmación de contaminación cruzada son útiles cuando se los emplea en forma complementaria.

En la vasta mayoría de los eventos analizados, los resultados de la genotipificación fueron avalados por la información bacteriológica, los registros de protocolos de laboratorio y/o la información clínico-epidemiológica.

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a Lucía Barrera, Jefa del Servicio de Micobacterias del Instituto Nacional de enfermedades Infecciosas ANLIS “Carlos G. Malbrán” y al personal de su laboratorio por hacer posible la ejecución de este estudio, y a los miembros de la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis por compartir la información necesaria para su realización.

A Ana María Reniero, la micobacterióloga que demostró contaminación cruzada de *M. tuberculosis* por primera vez en la Argentina y cedió gentilmente sus datos para la elaboración de esta tesis. A Viviana Ritacco por confiar en mí.

REFERENCIAS

- Alonso V, Paul R, Barrera L, Ritacco V. Falso diagnóstico de tuberculosis por cultivo. *Medicina (Buenos Aires)* 2007; **67**: 287-94.
- Alonso V, Paul R, López B, Barrera L, Ritacco V. Genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* para la vigilancia de contaminación cruzada en laboratorios de la Red Nacional de Tuberculosis. Libro de Resúmenes, II Congreso Argentino de Redes de Laboratorio, ANLIS “Dr. C. G. Malbrán”, Buenos Aires, 2005: 10-11.
- Barrera L. The basics of clinical bacteriology. En Tuberculosis 2007: From Basic science to patient care. Disponible en Internet en: <http://www.tuberculosis-textbook.com>
- Bauer J, Thomsen VO, Poulsen S, Andersen AB. False-positive results from cultures of *Mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross-contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 988-91.
- Bearman G, Vaamonde C, Larone D, Drusin L, Zuccotti G. Pseudo-outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* associated with presumed laboratory processing contamination. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; **23**: 620-2.
- Bhattacharya M, Dietrich S, Mosher L, Siddiqui F, Reisberg BE, Paul WS, Warren JR. Cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis*: clinical significance, causes, and prevention. *Am J Clin Pathol* 1998; **109**: 324-30.
- Braden CR, Morlock GP, Woodley CL, Johnson KR, Colombel AC, Cave MD, Yang Z, Valway SE, Onorato IM, Crawford JT. Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 42-47.
- Burman WJ, Reves RR. Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoiding unnecessary treatment. *Clin Infect Dis* 2000; **31**: 1390-5.
- Burman WJ, Reves RR, Hawkes AP, Rietmeijer CA, Yang Z, El-Hajj H, Bates JH, Cave MD. The incidence of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **155**: 321-6.
- Carroll NM, Richardson M, Engelke E, de Kock M, Lombard C, van Helden PD. Reduction of the rate of false-positive cultures of *Mycobacterium tuberculosis* in a laboratory with a high culture positivity rate. *Clin Chem Lab Med* 2002; **40**: 888-92.
- Carroll NM, Richardson M, van Helden PD. Criteria for identification of cross-contamination of cultures of *Mycobacterium tuberculosis* in routine microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 2269.
- Casimir L, Lovadina L, Paul R, et al. Falsos diagnósticos de tuberculosis como resultado de contaminación cruzada de cultivos. Libro de Resúmenes, XVII Congreso Latinoamericano y X Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Asociación Latinoamericana de Microbiología y Sociedad Argentina de Microbiología, 2004: P133.
- Cataldi A, Romano MI. Tuberculosis caused by other members of the *M. tuberculosis* Complex. En Tuberculosis 2007: From Basic science to patient care. Disponible en Internet en: <http://www.tuberculosis-textbook.com>.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; **393**: 537-44.

Cronin W, Rodriguez E, Valway S, Bur S, Hooper N, Smithwick R, Butler WR, Dwyer D. Pseudo-outbreak of tuberculosis in an acute-care general hospital: epidemiology and clinical implications. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; **19**: 345-7.

Das S, Narayanan S, Hari L, Mohan NS, Somasundaram S, Selvakumar N, Narayanan PR. Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* identified by restriction fragment length polymorphism analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; **8**: 267-70.

de Boer AS, Blommerde B, de Haas PE, Sebek MM, Lambregts-van Weezenbeek KS, Dessens M, van Soolingen D. False-positive *Mycobacterium tuberculosis* cultures in 44 laboratories in The Netherlands (1993 to 2000): incidence, risk factors, and consequences. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 4004-9.

de Waard JH, Robledo J. Conventional Diagnostic Methods. En *Tuberculosis 2007: From Basic science to patient care*. Disponible en Internet en: <http://www.tuberculosis textbook.com>

del Portillo P, Reyes A, Salazar L, Menéndez M del C, García M. Genomics and Proteomics. En *Tuberculosis 2007: From Basic science to patient care*. Disponible en Internet en: <http://www.tuberculosis textbook.com>

Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* 1996; **64**: 683-90.

Fischl MA, Uttamchandani RB, Daikos GL, Poblete RB, Moreno JN, Reyes RR, Boota AM, Thompson LM, Cleary TJ, Lai S. An outbreak of tuberculosis caused by multiple-drug-resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection. *Ann Intern Med* 1992; **117**: 177-83.

Fitzpatrick L, Braden C, Cronin W, English J, Campbell E, Valway S, Onorato I. Investigation of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 52-4.

Friedman CR, Stoekle MY, Jonhson Jr.WD, Riley LW. Double repetitive element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 1383-4.

Frothingham R, Meeker-O'Connell1 WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998; **144**: 1189-96.

Gascoyne-Binzi DM, Barlow RE, Frothingham R, Robinson G, Collyns TA, Gelletlie R, Hawkey PM. Rapid identification of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using variable number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 69-74.

Glynn JR, Yates MD, Crampin AC, Ngwira BM, Mwaungulu FD, Black GF, Chaguluka SD, Mwafulirwa DT, Floyd S, Murphy C, Drobniewski FA, Fine PE. DNA fingerprint changes in tuberculosis: reinfection, evolution, or laboratory error? *J Infect Dis* 2004; **190**: 1158-66.

Gopaul KK, Brown TJ, Gibson AL, Yates MD, Drobniewski FA. Progression toward an improved DNA amplification-based typing technique in the study of *Mycobacterium tuberculosis* epidemiology. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 2492-8.

Gori A, Bandera A, Marchetti G, Degli Esposti A, Catozzi L, Nardi GP, Gazzola L, Ferrario G, van Embden JD, van Soolingen D, Moroni M, Franzetti F. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis* 2005; **11**: 1242-8.

Gutiérrez MC, Vincent V, Aubert D, Bizet J, Gaillot O, Lebrun L, Le Pendeven C, Le Penec MP, Mathieu D, Offredo C, Pangon B, Pierre-Audigier C. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 486-92.

Haas WH, Butler WR, Woodley CL, Crawford JT. Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 1293-8.

- Heersma HF, Kremer K, van Embden JD. Computer analysis of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Mol Biol* 1998; **101**: 395-422.
- INER (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Emilio Coni”). La tuberculosis en la Republica Argentina). Notificación de casos, magnitud del problema, mayo 2006.
- 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; **35**: 907–14.
- Kantor IN, Barcat JA., Ritacco V. Viability of mycobacterium in formalin fixed tissues. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; **3**: 362.
- Kremer K, Arnold C, Cataldi A, Gutiérrez MC, Haas WH, Panaiotov S, Skuce RA, Supply P, van der Zanden AG, van Soolingen D. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 5628–38.
- Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martín C, Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakrus MA, Musser JM, van Embden JD. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 2607–18.
- Leão SC, Bernardelli A, Cataldi A, Zumarraga M, Robledo J, Realpe T, Mejía GI, da Silva Telles MA, Chimara E, Velazco M, Fernandez J, Rodrigues PA, Guerrero MI, León CI, Porras TB, Rastogi N, Goh KS, Suffys P, da Silva Rocha A, dos Santos Netto D, Ritacco V, López B, Barrera L, Palomino JC, Martin A, Portaels F. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. *J Microbiol Methods* 2005; **61**: 193-9.
- Martin A, Portaels F. Drug Resistance and Drug Resistance Detection. En *Tuberculosis 2007: From Basic science to patient care*. Disponible en Internet en: <http://www.tuberculosistextbook.com>
- Martínez M, García de Viedma D, Alonso M, Andrés S, Bouza E, Cabezas T, Cabeza I, Reyes A, Sánchez-Yebra W, Rodríguez M, Sánchez MI, Rogado MC, Fernández R, Peñafiel T, Martínez J, Barroso P, Lucerna MA, Diez LF, Gutiérrez C. Impact of laboratory cross-contamination on molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 2967–69.
- Moore DA, Caviedes L, Gilman RH, Coronel J, Arenas F, LaChira D, Salazar C, Carlos Saravia J, Oberhelman RA, Hollm-Delgado MG, Escombe AR, Evans CA, Friedland JS. Infrequent MODS TB culture cross-contamination in a high-burden resource-poor setting. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; **56**: 35-43.
- Morcillo N, Zumarraga M, Alito A, Dolmann A, Schouls L, Cataldi A, Kremer K, van Soolingen D. A low cost, home-made, reverse-line blot hybridisation assay for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; **11**: 959-65.
- National TB Controllers Association. CDC Advisory Group on Tuberculosis Genotyping. Guide to the application of genotyping to tuberculosis prevention and control. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; June 2004.
- Nivin B, Fujiwara PI, Hannifin J, Kreiswirth BN. Cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis*: an epidemiological and laboratory investigation. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; **19**: 500-3.

Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 1. Baciloscopia. 2008. www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-labs-baciloscopia.pdf

PAHO. <http://www.paho.org/Spanish/DD/PIN/ps070323.htm>

Palmero DJ. Tuberculosis and HIV/AIDS. En Tuberculosis 2007: From Basic science to patient care. Disponible en Internet en: <http://www.tuberculosisistextbook.com>

Poggio G, Togneri A, Reniero A, Insúa A, Guerra A, Dinerstein E, Kantor IN, Ritacco V. AIDS-related multidrug resistant tuberculosis “M” strain spreads within two hospitals in Buenos Aires suburbs. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; **1** (Suppl 1): 523.

Ramos MC, Soini H, Roscanni GC, Jaques M., Villares MC, Musser JM. Extensive cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 916–9.

Rastogi N, Sola C. Molecular Evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. En Tuberculosis 2007: From Basic science to patient care. Disponible en Internet en: <http://www.tuberculosisistextbook.com>

Reisig F, Kremer K, Amthor B, van Soolingen D, Haas WH. Fast ligation-mediated PCR, a fast and reliable method for IS6110-based typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 5622–7.

Reniero A, Moscatelli J, Kantor IN, Ritacco V. Early detection of *Mycobacterium tuberculosis* laboratory cross-contamination in a Buenos Aires hospital. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; **3** (Suppl. 1): 173.

Ritacco V, Reniero A, Ambroggi M, Barrera L, López B, Di Lonardo M, Kantor IN. Inter-hospital spread of multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. *Tubercle Lung Disease* 1996; **77** (Suppl 2):64.

Ritacco V, Di Lonardo M, Reniero A, Ambroggi M, Barrera L, Dambrosi A, Lopez B, Isola N, de Kantor IN. Nosocomial spread of Human Immunodeficiency Virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. *J Infect Dis* 1997; **176**: 637-42.

Ritacco V, López B, Paul R, Reniero A, Di Lonardo M, Casimir L, Togneri A, Kaufman S, Barrera L. Falsos cultivos positivos por contaminación cruzada en laboratorios de tuberculosis. *Rev Argent Microbiol* 2002; **34**: 163-6.

Ritacco V, Togneri A, López B, Moscatelli J, Reniero A, Barrera L. An unusually prolonged episode of mycobacterial cross-contamination in a diagnostic laboratory. Resúmen, XX Congreso Brasileiro de Microbiología. Salvador BA, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999, p. 420.

Ruddy M, McHugh TD, Dale JW, Banerjee D, Maguire H, Wilson P, Drobniewski F, Butcher P, Gillespie SH. Estimation of the rate of unrecognized cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis* in London microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 4100-4.

Ruiz M, Torres MJ, Llanos AC, Arroyo A, Palomares JC, Aznar J. Direct detection of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in auramine-rhodaminepositive sputum specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 1585-9.

Segal-Maurer S, Kreiswirth BN, Burns JM, Lavie S, Lim M, Urban C, Rahal JJ Jr. *Mycobacterium tuberculosis* specimen contamination revisited: the role of laboratory environmental control in a pseudo-outbreak. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1998; **19**: 101-5.

Small PM, McClenny NB, Singh SP, Schoolnik GK, Tompkins LS, Mickelsen PA. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 1677–82.

- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsç-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; **44**: 4498–510.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 3563-71.
- Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 3578–82.
- Tortoli E, Palomino J. New Diagnostic Methods. En Tuberculosis 2007: From Basic science to patient care. Disponible en Internet en: <http://www.tuberculosisistextbook.com>.
- van Deutekom H, Supply P, de Haas P, Willery E, Hoijng S, Locht C, Coutinho R, van Soolingen D. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4473–9.
- van Duin JM, Pijnenburg JE, van Rijswoud CM, de Haas PE, Hendriks WD, van Soolingen. Investigation of cross contamination in a *Mycobacterium tuberculosis* laboratory using IS6110 DNA fingerprinting. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; **1**: 425-9.
- van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, Small PM. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 406–9.
- van Rie A, Victor TC, Richardson M, Johnson R, van der Spuy GD, Murray EJ, Beyers N, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM. Reinfection and mixed infection cause changing *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance patterns. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; **172**: 636-42.
- van Soolingen D, de Haas PEW, Hermans PWM, Groenen P, van Embden JDA. Comparison of various repetitive DNA elements as generic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 1987–95.
- Varela G, Carvajales S, Gadea P, Sirok A, Grotiuz G, Mota MI, Ritacco V, Reniero A, Rivas C, Schelotto F. Comparative molecular study of *Mycobacterium tuberculosis* strains, in times of antimicrobial drug resistance. *Rev Argent Microbiol* 2005; **37**: 11-5.
- Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, Beyers N, Gey van Pittius NC, van Helden PD. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; **169**: 610-4.
- WHO. Global tuberculosis control surveillance, planning, financing. 2007 Disponible en Internet: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
- Wurtz R, Demarais P, Trainor W, McAuley J, Kocka F, Mosher L, Dietrich S. Specimen contamination in mycobacteriology laboratory detected by pseudo-outbreak of multidrug-resistant tuberculosis: analysis by routine epidemiology and confirmation by molecular technique. *J Clin Microbiol* 1996; **34**: 1017–9.
- Yan JJ, Jou R, Ko WC, Wu JJ, Yang ML, Chen HM. The use of variable-number tandem-repeat mycobacterial interspersed repetitive unit typing to identify laboratory cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; **52**: 21-8.