

Métodos de diagnóstico en la infección tuberculosa

Sara Mónica Ferriz Pérez¹, Pilar Puente Águeda², Carmen Ybarra de Villavicencio¹,
Fernando Gutiérrez Sánchez³, Francisco Hervás Maldonado⁴

Med Mil (Esp) 2002; 58 (3): 22-26

RESUMEN

Con el paso del tiempo, desde su descubrimiento hasta nuestros días, la tuberculosis no sólo no ha sido erradicada sino que afecta aproximadamente a un tercio de la población mundial. La aparición del Virus de Inmunodeficiencia Humana ha contribuido al recrudecimiento y diseminación de ésta, modificando los patrones convencionales de tratamiento utilizados. La propagación más fácil entre determinados grupos de población, como aquellos que presentan escaso nivel económico o deficientes medidas higiénico-sanitarias favorecen la diseminación a la población general. Las medidas de control de la enfermedad, además de la mejora en dichos aspectos carenciales, obtienen en el diagnóstico rápido y preciso una herramienta esencial. En este artículo los autores quieren revisar las distintas técnicas que confirman, a nivel del laboratorio, el diagnóstico clínico de infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

PALABRAS CLAVE: Tuberculosis - Diagnóstico.

“Es muy probable, y no puede pensarse en esto sin emoción, que en esa lista figure entre los caídos, un día no muy remoto, la pesadilla de tantas generaciones de seres humanos, la tuberculosis.”

GREGORIO MARAÑÓN, 1948.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB), enfermedad infecciosa que se consideró susceptible de erradicación a mediados de este siglo, mantiene hoy en día, en los inicios del siglo XXI, unas cifras de infección muy elevadas: se calculan unos 1.700 millones de infectados por *Mycobacterium tuberculosis* en todo el mundo, lo que supone la tercera parte de la población mundial (1).

La distribución geográfica de la enfermedad va a afectar principalmente y de modo más severo a los países en vías de desarrollo, donde la mortalidad debida a la TB es alta. La situación sociopolítica, las deficiencias sanitarias, el escaso nivel económico, el hacinamiento, las migraciones, la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), etc. hacen de la población residente en dichos países un caldo de cultivo idóneo para la proliferación y diseminación tuberculosa. En los países desarrollados, dónde cabría esperar bajas cifras de infección, sorprende apreciar que, lejos de desaparecer, la tuberculosis mantiene unos

niveles preocupantes. Este recrudecimiento se ha visto favorecido por la aparición de la gran plaga de este siglo, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), siendo la TB en muchos casos una manifestación clínica más dentro del cuadro general de SIDA desarrollado (2).

En nuestro país, la tasa de incidencia en el año 1999 de TB respiratoria y meníngea fue de 21,05 casos de cada 100.000 habitantes, ocupando el segundo lugar dentro de la Unión Europea detrás de Portugal. Además, los datos procedentes del Proyecto Multicéntrico de Investigaciones sobre Tuberculosis (PMIT), coordinado por el Instituto de Salud Carlos III, ponen de manifiesto una tasa de incidencia de 38,5 casos/100.000 habitantes en el período comprendido entre Mayo de 1996 y Abril de 1997, observando una marcada interacción entre TB y VIH en España, puesto que el 18% de los pacientes estudiados presentaban infección por VIH es decir, casi la mitad de la tasa de incidencia (3). La tabla 1 refleja las tasas de incidencia de casos de SIDA con tuberculosis desde el año 1994 a 1998.

Junto a estos datos no debemos olvidar el aumento creciente de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes al menos a un fármaco del tratamiento antituberculoso convencional (4-8). La posibilidad de diseminación de dichas cepas entre la población general complicaría aún más la situación actual, si bien es cierto que dichas cepas resistentes al tratamiento afectan predominantemente a subgrupos poblacionales con marcadas características como son los estados de descenso de la inmunidad. (9-12).

¹ Cap. Médico

² Cap. Farmacéutico

³ Cte. Médico

⁴ Teol. Médico

Servicio de Microbiología Clínica.
Hospital Militar Central Gómez Ulla.

Dirección para correspondencia: fhervas@terra.es.

Recibido: 30 de enero de 2001.

Aceptado: 13 de febrero de 2002.

Tabla 1. Registro Nacional de casos de Sida.

Año	Casos de SIDA con tuberculosis				
	Casos de SIDA	Nº	%	Tasa 100.000 habitantes	Descenso interanual (%)
1994	7199	2.977	41,8	7,6	—
1995	6870	2.610	38,4	6,7	12,3
1996	6449	2.115	35,9	5,9	19,0
1997	4648	1.621	35,1	4,2	23,4
1998	3945	1.344	34,2	3,4	17,1

Por último resaltar en cuanto a nuestro país se refiere el fenómeno de la inmigración, en aumento día a día. Estos movimientos poblacionales pueden favorecer la importación de cepas de *M. tuberculosis* "extrañas", con variaciones patogénicas y modificaciones en su comportamiento clínico y respuesta terapéutica (13).

La revisión de este tema está especialmente dirigida a las Fuerzas Armadas como una muestra representativa de la población general que se desplaza geográficamente a zonas catastróficas o en conflicto bélico, donde las condiciones higiénico-sanitarias pueden no ser las deseables, permaneciendo sus miembros en convivencia cerrada durante períodos de tiempo prolongados.

CONCEPTOS GENERALES

El género *Mycobacterium* engloba más de 100 especies clasificadas en seis grupos desde el punto de vista bacteriológico. Con fines didácticos, se dividen en tres apartados: complejo tuberculoso, complejo lepra y otras Micobacterias.

Mycobacterium tuberculosis pertenece al grupo "Complejo tuberculoso", junto con *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum*, todas ellas productoras de TB. En cuanto a sus características, *M. tuberculosis* es un bacilo ácido alcohol resistente (BAAR), que se tiñe de color rojo brillante sobre fondo azul con la tinción de Ziehl-Neelsen. Presenta forma recta o ligeramente curvada, en ocasiones ramificado; es inmóvil y no formador de esporas. De crecimiento lento o muy lento, sus colonias tardan en visualizarse entre 2 y 60 días a una temperatura óptima, mostrando coloración variable desde amarillo claro al rosa, de superficie rugosa, excrecentes, mates, con aspecto de "coliflor o de "miga de pan". Es muy resistente a la desecación y a la desinfección por lo que se distribuye ampliamente en suelo y agua (12-14).

Se transmite por vía aérea, al inhalar pequeñas gotas en aerosol capaces de alcanzar el alvéolo pulmonar que contienen en su interior los bacilos. Estos pequeños núcleos, tras su emisión en las secreciones de un paciente infectado de TB pueden permanecer en el ambiente durante períodos de tiempo prolongados.

Cuando se produce la colonización, se activa la respuesta inmune celular en la que intervienen macrófagos y linfocitos T, deteniéndose la multiplicación bacilar. En un bajo porcentaje de casos, esta reacción inmune no va a resultar eficaz, desarrollándose la infección tuberculosa. Además, algunos de los bacilos pueden permanecer acantonados intracelularmente de forma latente, desarrollando la enfermedad tras un largo período de tiempo por reactivación endógena (1).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La localización más frecuente de tuberculosis es la pulmonar, que cursa con un comienzo insidioso, poco específico, de larga duración (10-15 días), presentando febrícula o fiebre no muy elevada persistente, malestar general, astenia y tos productiva con emisión de esputos mucopurulentos que en fases avanzadas pueden ser hemoptoicos. Radiológicamente la imagen más típica es el infiltrado pulmonar, a veces cavitado, de predominio en lóbulos superiores con o sin derrame pleural asociado. En ocasiones la TB puede

afectar otros órganos vitales como riñón, ganglios linfáticos, sistema nervioso central, huesos o hígado, siendo esta forma de tuberculosis diseminada más típica de los estados inmunodepresivos (1).

Ante un cuadro clínico sugestivo de TB, deberá realizarse el test de Mantoux o prueba de la tuberculina. Esta prueba va a evidenciar la activación de la respuesta inmune del supuesto infectado frente a *M. tuberculosis*, aunque también puede ser positiva en el caso de vacunación antituberculosa (BCG).

La prueba consiste en la administración intradérmica en la cara anterior del antebrazo de 2 unidades de tuberculina PPD RT-23, extracto proteico del bacilo tuberculoso. La lectura se hará a las 72 horas, midiendo en milímetros la induración si la hubiera en el punto de inoculación. La reacción eritematosa sin induración se registrará como 0 milímetros.

Se considera Mantoux positivo con una induración ≥ 5 mm. Cada caso deberá valorarse individualmente, especialmente si el individuo a estudio ha sido vacunado con anterioridad. En este caso, se considerarán igualmente como límite de positividad los 5 mm, debiendo hacer una encuesta epidemiológica exhaustiva para determinar los posibles contactos y valoración meticulosa de las pruebas clínicas complementarias con el fin descartar que no se trate de una reacción secundaria a la vacunación.

En la interpretación de una prueba tuberculínica negativa, se valorará:

- a) No antecedentes de vacunación BCG:
 - < 65 años: Se acepta como resultado negativo
 - > 65 años, repetir la prueba a los 7-10 días de la primera
- b) Sí antecedentes de vacunación, repetir 7-10 días después de la primera sin considerar la edad (1).

DIAGNÓSTICO

Los laboratorios de microbiología, según el servicio que ofrecen en relación con las micobacterias, se clasifican en tres categorías:

Nivel I: Recogida y transporte de muestras y examen microscópico de éstas en busca de BAAR (baciloscopia). Es el laboratorio elemental.

Nivel II: Los mismos del nivel I y además aislamiento e identificación de *M. tuberculosis* y posibilidad de estudios de sensibilidad in vitro. Es el laboratorio de especialidad.

Nivel III: Los anteriores más la identificación de todas las micobacterias y estudios de sensibilidad obligados. Es el laboratorio de referencia (17).

Las muestras que se pueden procesar para el aislamiento del bacilo tuberculoso son variadas, en dependencia del lugar donde se localice la infección: esputo, orina, heces, LCR, líquidos de drenaje, biopsias, etc. De todas ellas, dada la mayor incidencia de TB respiratoria, la que con más frecuencia se procesa es el esputo. Para obtener el máximo rendimiento en esta muestra, se recomienda la siguiente pauta de recogida: dentro de los 5 días previos a su recogida, el paciente deberá permanecer sin tratamiento antibiótico alguno, ya que éste puede interferir en la viabilidad de las micobacterias. Se tomarán al menos tres muestras del mismo paciente en días consecutivos, puesto que la emisión de bacilos puede ser fluctuante. Tras la recogida, se transportarán a la mayor brevedad posible, en envase herméticamente cerrado y refrigeradas al labora-

torio de microbiología de referencia. Hasta el momento del envío, se conservarán en nevera refrigerada a 4° C de temperatura, con el fin de asegurar las condiciones de las muestras (15).

La confirmación diagnóstica de tuberculosis se realizará mediante las técnicas microbiológicas que, según su complejidad, las agruparemos en tres apartados: tinción y microscopía, cultivo en medios sólidos/líquidos más reacciones bioquímicas y pruebas moleculares.

1. TINCIÓN Y OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA:

No podemos olvidar que la no observación de bacilos ácido-alcohol resistentes en las diferentes tinciones de las muestras a estudiar, no implica la no existencia de dichos microorganismos en las mismas. Hay que tener en cuenta la distinta sensibilidad de los diferentes medios de observación microscópica para este microorganismo.

La tinción recomendada universalmente para la visualización de las micobacterias es la de Ziehl-Neelsen o su modificada (tinción de Kinyoun). En ambas técnicas los bacilos aparecen teñidos de rojo sobre fondo azul (Ziehl-Neelsen) o fondo verde azulado (Kinyoun). En el caso de que el volumen de muestras sea elevado (superior a diez), la técnica preferida por su mayor rapidez en cuanto a interpretación es la de fluorescencia con auramina, recurriendo en caso de alteraciones de la morfología bacilar al Ziehl clásico como técnica de confirmación (16-18).

Las preparaciones teñidas con las dos primeras técnicas se estudiarán con el microscopio óptico con aceite de inmersión a x100 aumentos mientras que en el caso de la técnica de auramina la observación de la muestra se llevará a cabo con el microscopio de inmunofluorescencia sin aceite de inmersión. Los resultados del examen microscópico se expresarán en número aproximado de bacilos visualizados (bacilos por largo). La sensibilidad de esta técnica es variable (desde un 20 a un 80%) dependiendo de algunos factores como la calidad y origen de la muestra y una correcta preparación y observación (16-18).

2. CULTIVO Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS:

Antes de realizar el cultivo de la muestra, tanto si la siembra se realiza en medio sólido como en medio líquido, se le deberá someter a procesos de digestión y descontaminación, variables según el tipo y el origen de la muestra, siguiendo los métodos estándar publicados en la bibliografía internacional (19,20).

Todas las muestras sospechosas de contener micobacterias se deben sembrar en los medios apropiados puesto que:

1. Los cultivos poseen una alta sensibilidad respecto al estudio microscópico, pudiendo detectar la presencia de pequeñas cantidades de bacilos.

2. Necesidad de los aislamientos en cultivo puro para la posterior identificación de la especie.
3. El cultivo permite un seguimiento de los tratamientos ya instaurados (16).

1. IDENTIFICACIÓN:

Se pueden diferenciar dos tipos de medios de cultivo: sólidos y líquidos.

- 1.1. **Medios sólidos:** Los más utilizados son los que contienen base de huevo, como el Lowenstein-Jensen y Coletsos, pero también se utilizan los semisintéticos con agar, como el 7H10 y 7H11 de Middlebrook (21).

Tras la siembra, los tubos de cultivo se someten a incubación prolongada, en posición horizontal, en estufa enriquecida con un 5-10% de CO₂ y a una temperatura de 36° C ± 1.

La velocidad de crecimiento para la aparición de colonias visibles en el medio de cultivo va a variar según la especie, siendo superior a 7 días para el grupo de micobacterias de crecimiento lento entre las que se encuentra *M. tuberculosis*, (tiempo medio de crecimiento entre 15 y 30 días) (1). Una vez que se ha obtenido crecimiento, en dependencia de las características de éste (temperatura y tiempo), morfología de las colonias y comportamiento frente a una serie de pruebas bioquímicas se puede llegar a una identificación aproximativa de especie. Así, los resultados obtenidos se recogen en la tabla 2 (17).

- 1.2. **Medios líquidos:** Aportan un crecimiento mejor y más rápido de las micobacterias que los medios sólidos. Los medios líquidos, a su vez, se clasifican en medios de lectura manual, de lectura semiautomática y medios de lectura automatizada (21,22)

Los de lectura manual presentan respecto a los segundos el inconveniente de la lentitud en la detección del crecimiento, que no permiten realizar los test de sensibilidad *in vitro* y que el sistema de identificación presenta en ocasiones falsos positivos.

Los medios de lectura semiautomáticos (sistema BACTEC), utilizan el medio de cultivo líquido Middlebrook 7H12, con un sustrato marcado con C¹⁴. Durante el crecimiento se libera C¹⁴O₂, que es detectado por el sistema y lo traduce en índice de crecimiento. Sus inconvenientes son la utilización de reactivos radiactivos y el requerir manipulación de los viales a lo largo de todo el proceso; sus ventajas, detección rápida de crecimiento (15-20 días) y una mayor sensibilidad en cuanto a la identificación de *M. tuberculosis*.

Tabla 1. Identificación aproximativa de especie.

	Crecimiento	Coloración	Test Niacina	Reducción de Nitratos	Catalasa a 68° c	Pirazinamida
<i>M. tuberculosis</i>	15-30 días	Crema	+	+	-	Sensible
<i>M. bovis</i>	> 30 días	No	-	-	-	Resistente
<i>M. kansasii</i>	15-30 días	Fotoinducible	-	++	+	
<i>M. marinum</i>	1 semana (a 30° C)	Fotoinducible	-	-	-	
<i>M. avium</i>	15-30 días (a 42° C)	Naranja	-	-	+	Resistente
<i>M. scrofulaceum</i>	15-30 días	Naranja	-	-	+	

Los medios líquidos de lectura automatizada son dos: el sistema ESP (23), que utiliza el medio líquido 7H9 modificado con un suplemento de enriquecimiento y se basa en la detección de crecimiento mediante medida monométrica de aumentos de presión debidas al consumo de oxígeno; y el sistema MB/BacT que incorpora el medio líquido Middlebrook 7H9 modificado, que usando un sensor colorimétrico detecta la presencia de CO₂ como indicativo de crecimiento bacteriano. Estos sistemas automatizados suponen como ventaja respecto a los anteriores que la lectura de parámetros es automática, evitando así ninguna manipulación a lo largo de todo el proceso (16,21).

2. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD:

- 2.1. Métodos de referencia: Determinados por la OMS entre 1961 y 1969, permiten la reproducibilidad y comparación de los resultados. Son básicamente tres: método del cociente de resistencias de Michison (24), el método de concentraciones absolutas de Meissner (25) y por último el más utilizado, el de proporciones y diluciones múltiples de Canetti (26) Son en general técnicas lentas dado que se incorpora el fármaco a probar en el medio sólido de Lowenstein-Jensen y requiere para la lectura la visualización de las colonias, con lo que no se obtienen resultados hasta pasadas 3 ó 4 semanas. Algunas variantes, como el uso del medio Middlebrook 7H11, acortan algo el tiempo de lectura pero aun con estas modificaciones continúa siendo largo.
- 2.2. Sistemas radiométricos: Detecta el crecimiento bacteriano mediante un isótopo marcado incorporado al medio líquido junto con los fármacos. Los resultados se obtienen entre 5 y 10 días (16,21,27).

3. PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR:

Se utilizan tanto para la identificación de las distintas especies de micobacterias como para las pruebas de sensibilidad al tratamiento médico (28-30).

3.1. IDENTIFICACIÓN:

Permiten la identificación del microorganismo a partir de cultivo sólido o líquido, reduciendo el tiempo de diagnóstico.

- 3.1.1. Sondas de ácidos nucleicos: Es una técnica de alta sensibilidad, pero en ocasiones plantea dificultades a la hora de diferenciar las distintas especies pertenecientes al complejo *tuberculosis*. Consiste en la utilización de fragmentos de ADN marcados con sustancias luminiscentes (sondas), que son complementarias a porciones de ARN ribosomal (r-ARN) específicas de la micobacteria a estudio. De este modo se consiguen identificar algunas micobacterias como *tuberculosis complex*, *avium complex* o *kansasii* entre otras.
- 3.1.2. Secuenciación de ácidos nucleicos: Es la técnica de sensibilidad y especificidad más altas, aunque es utilizada por su especialización y alto coste en laboratorios de referencia. Amplificación y posterior secuenciación de un fragmento de r-ARN conocido común a todas las mico-

bacterias, el cual presenta unas regiones constantes y otras variables según el género y la especie de la micobacteria.

- 3.1.3. Polimorfismo de Fragmentos de Restricción: Amplificación y posterior digestión por enzimas de restricción de un fragmento cromosómico de las micobacterias. Los patrones de restricción que se obtienen son específicos de cada especie de micobacteria. Presenta como inconvenientes que requiere personal laboral altamente cualificado y su coste elevado, por lo que, al igual que la anterior, se utiliza en laboratorios de referencia.
- 3.1.4. Tipado de cepas de *M. tuberculosis*: Consiste en la extracción del ADN de cepas de *M. tuberculosis*, fragmentación mediante una enzima de restricción, electroforesis en gel de agarosa, transferencia a una membrana de nylon y detección de una determinada secuencia de inserción presente en las cepas mediante la hibridación con una sonda homóloga marcada con un reactivo luminiscente que impresionará posteriormente una placa radiográfica. Esta técnica es de gran utilidad en la detección de brotes de tuberculosis ocasionados en la comunidad por una misma cepa así como en la diferenciación de las recidivas de las reinfecciones exógenas y en el estudio de contaminaciones cruzadas dentro del propio laboratorio (31,32).

3.2. SENSIBILIDAD:

- 2.1. Detección de genes de resistencia: Se basa en la detección mediante técnicas moleculares de genes bacterianos identificados como determinantes de resistencia a algunos fármacos antituberculosos. Son pruebas muy laboriosas, dirigidas a estudios epidemiológicos y propias de laboratorios de referencia (33).

BIBLIOGRAFÍA

1. Caminero JA, Casal M, Ausina V, Pina J, Sauret J. Diagnóstico de la tuberculosis. Área Científica de "Tuberculosis e Infecciones Respiratorias"(TIR) de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR).
2. Informe del Grupo de trabajo de la Secretaría del Plan nacional sobre el Sida. Control de la tuberculosis en relación con la epidemia de infección por VIH/SIDA. Revista Española de Salud Pública. Abril de 1999.
3. Grupo de Trabajo del PMIT. La Tuberculosis en España: Resultados del Proyecto Multicéntrico de Investigación sobre Tuberculosis (PMIT). Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. Instituto de Salud Carlos III. (En prensa).
4. Rullán J, Herrera D, Cano R, Moreno V, Godoy P, Peiró E, et al. Nosocomial Transmission of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Spain. Emerging Infectious Diseases 1996; Vol. 2, nº 2:125-9.
5. Ausina V, Riutort N, Viñado B. et al. Prospective study of drug-resistant tuberculosis in a Spanish urban population including patients at risk for HIV infection. European Journal of Microbiology and Infectious Diseases 1995;14:105-10.
6. Rusch-Gerdes S. Epidemiology of resistant tuberculosis in Europe. Infection 1999; Suppl2:S17-8.
7. Communicable Disease report. Outbreak of hospital acquired multidrug resistant tuberculosis. United Kingdom PHLS Communicable Disease Surveillance Centre Weekly 1995.
8. Communicable Disease report. Outbreak of hospital acquired multidrug resistant tuberculosis. United Kingdom PHLS Communicable Disease Surveillance Centre Weekly 1995.
9. WHO-EC Collaborating Centres on AIDS. AIDS Surveillance in Europe-European Centre for the epidemiological monitoring of AIDS. Quarterly Report #45: March 1995.

10. Centers for Disease Control. Nosocomial Transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons-Florida and New York, 1988-1991. *MNWR* 1991;40:585-91.
11. Grupo de Trabajo sobre Tuberculosis. Consenso nacional para el control de la tuberculosis en España. *Medicina Clínica (Barcelona)* 1992;98:24-31.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care facilities, 1994. *MMWR* 1994;43(Nº RR-13).
13. Hucrga H, Lopez-Vélez R, Navas E, Gomez-Mampaso I. Clinicoepidemiological features of immigrants with tuberculosis living in Madrid, Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2000; 19(3):236-7.
14. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9ª ed. 1994. Williams and Wilkins. Baltimore.
15. Kubica GP, Wayne LG. *The Mycobacteria: a Sourcebook*. 1984; 1133-34.
16. Casal M, Guerrero A, Martín N, Moreno S, Nogales C. Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1999.
17. Ortega A, March J. *Manual de Técnicas en Micobacteriología*. Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias. Centro Nacional de Microbiología de Majadahonda. Madrid.
18. Berlin OGW. 1990. *Mycobacteria* p. 597-640. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*, 8ed. St. Louis.
19. Strong B, Kubica GP. *Isolation and Identification of Mycobacterium tuberculosis: a Guide for the Level II Laboratory*. U.S. Public Health Service publication nº 81-8390. Centers for Disease Control, Atlanta.
20. Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with *N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide* for culture of mycobacteria. *American Reviews of Respiratory Diseases*. 1963;87; G, Murphy T. 775-79.
21. NCCLS. 1990. *Quality Assurance for Commercially Prepared Microbiological Culture Media*. NCCLS document M-22ª. NCCLS, Villanova, Pa.
22. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK. 1991. *Mycobacterium* p.304-339. In Balows aA, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ., *Manual of Clinical Microbiology*, 5ªed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
23. Woods GL, Fish G, Plaunt M, Murphy T. Clinical evaluation of Difco ESP culture system II for Growth and detection of Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997, 35;121-24.
24. Michison DA. Laboratory techniques for the determination of sensitivity of tubercle bacillus to isoniazid streptomycin and PAS. *Lancet* 1953, 1:213.
25. Meissner G. The absolute concentration method for testing the susceptibility of mycobacterium tuberculosis to antimicrobial drug. WHO TB. Techn. Information 1961. 13-19.
26. Canetti G, Rist N, Grosset j. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. *Rev tuber* 1963, 27:217-272.
27. Beer J, Kuchler R, Rodloff AC. Investigations about the Possibility for Testing the Susceptibility of Mycobacteria with the MB/BacT Culture System. *J Lab Med* 1997, 21:390-98.
28. Pao CC, Yen TSB, You JB, Maa JS, Fiss EM, Chang CH. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28:1877-80.
29. Thierry D, Brisson-Noël A, Lévy-Frébault V, Nguyen S, Guesdon JL et al. Characterization of a *M. tuberculosis* insertion sequence IS6110, and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28: 2673-88.
30. Hermans PWM, Schuitema ARL, Van Sooligen D et al. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28: 1204-13.
31. Ross BC, Raios K, Jackson K et al. Identification of genetically distinct subspecies of *Mycobacterium Kansaii*. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; 30: 2930-33.
32. Ross BC, Raios K, Jackson K et al. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as epidemiological tool. *Journal of Clinical Microbiology* 1992;30: 942-6.
33. Kawa DE, Pennell D, Dubista LN, Schell RF. Development of a rapid methods for determining the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid using the Gen-Probe Dna hybridization system. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* 1989. 33:100-105.