

Utilidad del cultivo rápido

en medio líquido Bact/Alert 3D en el diagnóstico micobacteriano de muestras clínicas

Usefulness of rapid culture in liquid medium Bact / Alert 3D mycobacterial diagnosis of clinical samples.

Mederos Cuervo LM, Martínez Romero MR, Sardiñas Aragón M, García León G, Concepción Acosta CM, Díaz Rodríguez R.
Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis/Lepra/Micobacterias
Centro Colaborador OPS/OMS (IPK).
Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), La Habana, Cuba.
Autor por correspondencia: mederos@ipk.sld.cu

Resumen

La identificación acertada y rápida de las infecciones micobacterianas es muy importante pues un diagnóstico tardío de estas pueden provocar la diseminación de la enfermedad con graves consecuencias, en particular en pacientes con algún tipo de deterioro en su barrera inmunológica incluyendo pacientes VIH/sida. Por esta razón se hace necesario implementar nuevas herramientas diagnósticas con el objetivo de acortar el "tiempo de crecimiento". En el presente estudio se realizó la comparación entre el método convencional de cultivo en medio sólido Löwenstein-Jensen (L-J), y el método automatizado de cultivo rápido en medio líquido por Bact/Alert 3D. Se analizaron 547 muestras pulmonares y extrapulmonares procedentes de pacientes sintomáticos, de estas 278 (50.82%) pertenecían a pacientes VIH/sida. La identificación de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) se realizó mediante la determinación del TBAgMPT 64 por el test rápido SD BIOLINE, para la identificación de las micobacterias no tuberculosas (MNT) se utilizó el test bioquímico recomendado. Los resultados obtenidos respecto al número de aislamientos micobacterianos fueron: 46 (76,67%) por el medio sólido L-J, 54 (90,00%) por Bact/Alert 3D, mientras que por ambos métodos de cultivo se logró obtener 40 aislamientos. (66,67%). Por especies *Mycobacterium tuberculosis* fue el agente etiológico de mayor por ciento de aislamiento (82,93%). El método de cultivo rápido en medio líquido por el equipo Bact/Alert 3D mostró un 90,91% de sensibilidad, 95,08% de especificidad, 94,48% de concordancia y 0,86 de índice de Youden. Por lo anteriormente expuesto debemos destacar la importancia diagnóstica de estas infecciones para poder enfrentar el correcto y oportuno tratamiento específico tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunodeficientes, grupo poblacional de alto riesgo.

Palabras claves: infecciones micobacterianas, medio sólido Löwenstein-Jensen (L-J), medio líquido Bact/Alert 3D, test TB Ag MPT 64, *Mycobacterium tuberculosis*, micobacterias no tuberculosas (MNT).

Summary

The accurate and rapid identification of mycobacterial infections is very important as a late these can cause the spread of disease with serious consequences, particularly in patients with some form of deterioration in their immune barrier including HIV / AIDS patients diagnosis. For this reason it is necessary to implement new diagnostic tools in order to shorten the "time of growth". the comparison between the conventional culture method Lowenstein-Jensen solid medium (L-J), and automated method of rapid culture in liquid medium by Bact / Alert 3D was done in this study. 547 pulmonary and extrapulmonary samples from symptomatic patients, of these 278 (50.82%) were HIV / AIDS patients were analyzed. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) was performed by determining the TBAgMPT 64 SD BIOLINE rapid test for the identification of non-tuberculous mycobacteria (NTM) biochemical test used recommended. The results regarding the number of mycobacterial isolates were: 46 (76.67%) by the solid medium L-J, 54 (90.00%) by Bact / Alert 3D, while both methods of cultivation was possible to obtain 40 isolates. (66.67%). By species *Mycobacterium tuberculosis* was the etiologic agent isolation highest percentage (82.93%). The method of rapid culture in liquid medium by Bact / Alert 3D team showed a 90.91% sensitivity, specificity 95.08%, 94.48% and 0.86 concordance Youden index. For the above we must emphasize the diagnostic importance of these infections to face the correct and timely specific treatment in both immunocompetent and immunodeficient, high/risk population group.

Keywords: mycobacterial infections, Lowenstein-Jensen solid medium (L-J), liquid medium Bact / Alert 3D, TB test Ag MPT 64, *Mycobacterium tuberculosis*, non-tuberculous mycobacteria (NTM).

La tuberculosis (TB) es una enfermedad cuya presencia ha sido constante en la historia de la humanidad. Quizás la primera “cita bibliográfica” que se pueda hallar en relación a ella, se encuentre en los libros del Antiguo Testamento, donde se hace referencia a la enfermedad consuntiva que afectó al pueblo judío durante su estancia en Egipto, tradicional zona de gran prevalencia de la enfermedad. A pesar de existir desde tiempos remotos, no puede ser considerada como una enfermedad del pasado, ya que actualmente mueren aproximadamente 2 millones de personas por año en el mundo. A pesar de la antigüedad de la TB, el desconocimiento sobre su etiopatogenia ha sido considerable hasta fechas recientes, lo que claramente ha influido en contra del control de la enfermedad^{1,2}.

En la actualidad esta enfermedad es uno de los principales problemas de Salud Pública, sin embargo su evolución histórica ha sido un constante declinar en los países desarrollados, siguiendo a la mejora de las condiciones socioeconómicas y al descubrimiento de fármacos eficaces para su tratamiento. Esta tendencia decreciente se ha modificado en las últimas décadas, sobre todo a expensas de determinados grupos sociales más desfavorecidos y de la aparición de la pandemia por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)³.

Los cuadros clínicos de las infecciones provocadas por el género *Mycobacterium* pueden ser disímiles enmascarando el correcto diagnóstico de estas, provocando el avance de la enfermedad (tanto la TB como de las Micobacteriosis o infecciones producidas por especies micobacterianas no pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), en particular en pacientes con algún tipo de deterioro en su barrera inmunológica incluyendo pacientes VIH/sida donde el desenlace puede ser fatal pues son propensos a desarrollar formas diseminadas de la enfermedad. Por esta razón es necesario implementar nuevas herramientas diagnósticas donde obtengamos resultados en menor tiempo^{4,6}.

La introducción de tecnologías más modernas en los Laboratorios de Micobacteriología ha estado encaminada a acortar el tiempo diagnóstico, esto es esencial para que el paciente pueda comenzar una adecuada terapia e implementar un control efectivo de la infección, previniendo las peligrosas formas de diseminación que generalmente tienen graves consecuencias⁷⁻¹⁰.

El objetivo de nuestro estudio es demostrar la utilidad y ventajas del sistema automatizado de cultivo en medio líquido Bact/Alert 3D para el diagnóstico e identificación de especies micobacterianas a partir de muestras clínicas, especialmente en pacientes VIH/sida tratados en nuestra institución hospitalaria “Hospital Nacional de Referencia de Atención a pacientes VIH/sida, IPK”.

Este trabajo fue diseñado como estudio de tipo descriptivo-prospectivo de corte transversal. Se analizaron las muestras recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK) procedentes de pacientes sintomáticos incluyendo, pacientes VIH/sida tratados en nuestra institución hospitalaria “Hospital Nacional de Referencia de Atención a pacientes VIH/sida, IPK” durante el período julio 2015-julio 2016.

Se utilizaron las técnicas convencionales diagnósticas establecidas; examen directo aplicando la coloración de Zielh-Neelsen, y examen por cultivo donde, las muestras después de ser procesadas, fueron cultivadas simultáneamente en medio sólido Löwenstein-Jensen (L-J) y en medio líquido utilizando el equipo Bact/Alert 3D. El método de descontaminación para muestras pulmonares fue el método de Petroff modificado, para el caso de muestras extrapulmonares el método de descontaminación fue el del ácido sulfúrico al 4%. La temperatura de incubación fue de 37°C, las lecturas de los cultivos se realizaron cada 7 días, de aparecer crecimiento en ambos métodos se les realizó la coloración de Ziehl-Neelsen para confirmar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR)^{11,12}. Para la clasificación e identificación de los cultivos se utilizó el Kit inmunocromatográfico SD BIOLINE para la detección del TB Ag MPT64 presente solamente en el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, las cepas que dieron negativas por dicho test fueron clasificadas como micobacterias no tuberculosas (MNT), y para su identificación se utilizaron las técnicas fenotípicas-bioquímicas recomendadas en la literatura^{13,14}. Para la clasificación micobacteriana según Runyon se tuvieron en cuenta la velocidad de crecimiento (Vc) y producción de pigmentos (Pig). Para la identificación micobacteriana se realizaron las pruebas bioquímicas recomendadas; niacina, catalasa 68°C, nitrataza, arilsulfatasa, ureasa, lipasa o tween 80, telurito de potasio, toma de hierro, toma de NaCl 5% y pirazinamidas¹⁵⁻¹⁷.

Los resultados obtenidos fueron analizados y comparados con respecto a: número de aislamientos obtenidos, tiempo de detección de crecimiento (TDC) y tasa de contaminación (TC), también se calcularon los indicadores de desempeño del sistema automatizado Bact/Alert 3D. Para el análisis estadístico se utilizó el programa para análisis epidemiológico de datos tabulados EpiDATA versión 3.1 (EpiData Association, Dinamarca), con un intervalo de confianza del 95%¹⁸.

Para calcular los indicadores de calidad del Bact/Alert 3D se consideró como:

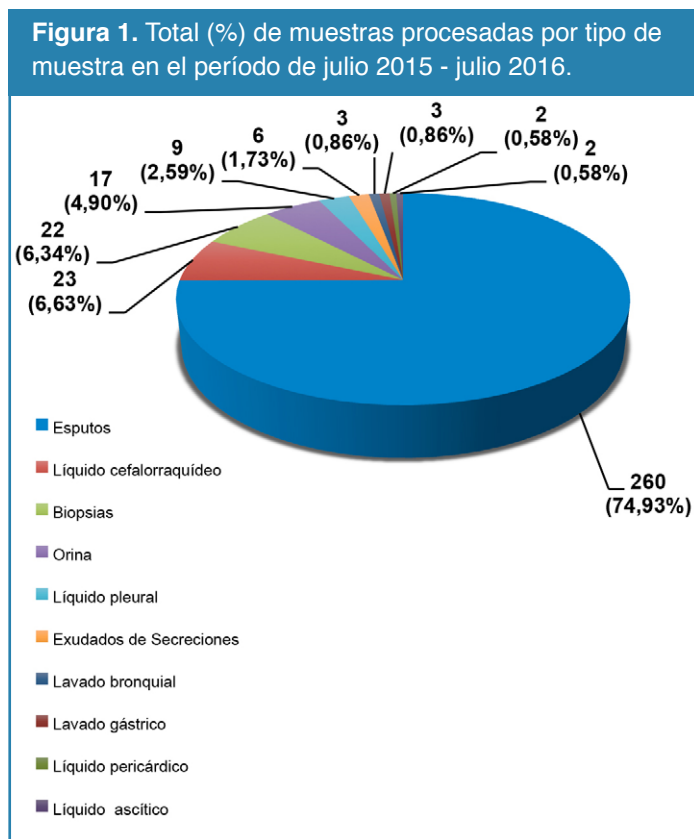
- ✓ Verdadero positivo: Muestras que se identificaron como positivas en ambos métodos de cultivo.
- ✓ Verdadero negativo: Muestras que se identificaron como negativas en ambos métodos de cultivo.

- ✓ Falso positivo: Las muestras que se identificaron como positivas por el equipo Bact/Alert 3D y resultaron negativas por el cultivo convencional.
- ✓ Falso negativo: Las muestras que se identificaron como negativo por el equipo Bact/Alert 3D y resultaron positivas por el cultivo convencional.

Resultados y discusión

Durante el período de estudio seleccionado en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de TB/Micobacteria/Lepra del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK) se recibieron, analizaron y procesaron 547 muestras tanto pulmonares como extrapulmonares, de estas 278 (50.82%) correspondieron a pacientes VIH/sida.

En la **Figura 1** se muestra el total de muestras procesadas.



Como podemos observar el mayor por ciento de muestras recibidas fueron esputo lo que reafirma una vez más que es la muestra por excelencia, por orden descendente le sigue el líquido cefalorraquídeo (LCR) y biopsias de tejido, mayoritariamente tejido ganglionar las cuales están descritas como la infección extrapulmonar más frecuente, le siguen; orina, líquido pleural, exudados de secreciones, contenido gástrico, líquido pericárdico y líquido ascítico.

A pesar de que el pulmón es el “órgano diana” por excelencia de la tuberculosis y las micobacteriosis, cualquier otro órgano o sistema pudiesen ser afectado. Los ganglios linfá-

ticos constituyen el sitio extrapulmonar más frecuente, éstos experimentan a su inicio un lento crecimiento indoloro que puede llegar a ulcerar la piel y convertirse en “fístulas drenantes”; y en ausencia del tratamiento específico la infección puede diseminarse y llegar incluso a ser mortal, sobre todo en pacientes con deficiencias crónicas en su sistema inmunológico, por ello en estos momentos los pacientes VIH/sida constituyen el mayor grupo de riesgo¹⁹⁻²².

El aumento de las infecciones micobacterianas coincide con el declive de la infección tuberculosa y el incremento de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), sobre todo en países desarrollados donde se está produciendo un aumento global de la incidencia de infecciones por especies no tuberculosas (MNT), principalmente en pacientes inmunodeficientes. Durante muchos años las micobacteriosis eran solo un hecho ocasional, sin embargo en las últimas décadas han pasado a ser una patología frecuente, considerándose ya como una enfermedad emergente^{17,23-25}.

En la **Tabla 1** se muestran los aislamientos obtenidos según métodos de cultivo utilizado; cultivo convencional en medio sólido Löwenstein-Jensen (L-J) y cultivo líquido utilizando el equipo Bact/Alert 3D. Al comparar los aislamientos obtenidos por ambos métodos de cultivo, estos no fueron estadísticamente significativos al obtenerse valores de $p > 0,05$.

Tabla 1. Comparación de los aislamientos de micobacterias obtenidos por cultivo en Löwenstein-Jensen (L-J) y Bact/Alert 3D.

	Aislamientos	L-J	Bact/Alert 3D	Valor de p	L-J Bact/Alert 3D
MTB	41	36 (87,80%)	39 (95,12%)	0,4293	34 (82,93%)
MNT	19	10 (52,63%)	15 (78,95%)	0,1714	6 (31,58%)
Total	60	46 (76,67%)	54 (90%)	0,0864	40 (66,67%)

Como se puede observar el cultivo automatizado Bact/Alert 3D supero al método convencional en 8 aislamientos (3 de MTB y 5 de MNT), resultados similares a los ya descritos en la literatura^{7,9,10}.

En la **Tabla 2** se observan los aislamientos obtenidos por ambos métodos de cultivo según tipo de muestra.

Tabla 2. Aislamientos de MTB y MNT por ambos métodos según tipo de muestra.

Tipo de muestra	MTB		MNT		Total
	No.	%	No.	%	
Espuito	38	14,62	15	5,77	53/260
Lavado bronquial	0	0	0	0	0/3
Líquido cefalorraquídeo	1	4,35	0	0	1/23
Biopsia	1	4,55	4	18,18	5/22
Orina	0	0	0	0	0/17
Líquido pleural	1	11,11	0	0	1/9
Exudados de Secreciones	0	0	0	0	0/6
Lavado gástrico	0	0	0	0	0/3
Líquido pericárdico	0	0	0	0	0/2
Líquido ascítico	0	0	0	0	0/2
Total	41	68,33	19	31,67	60/347

Como se puede observar *Mycobacterium tuberculosis* sigue siendo la especie más aislada. Es importante señalar que de las 41 cepas aisladas e identificadas como MTB; 31 (75,61%) correspondieron a pacientes VIH/sida, de estas 17(54,83%) fueron baciloscopia negativa (BK-). Por otra parte de las 19 cepas identificadas como MNT; 15 (78,95%) fueron procedentes de pacientes VIH/sida, de estas 12 (63,15%) fueron BK-.

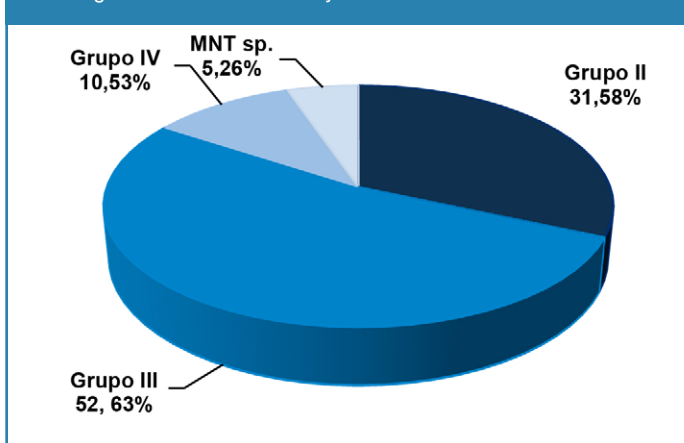
Se ha reportado que la densidad bacilar encontrada en pacientes BK+ está relacionada con el nivel de inmunosupresión del paciente. En los hospederos inmunocompetentes la TB desencadena una respuesta inmunológica de dos 2 tipos: a) la mediada por células, b) la hipersensibilidad retardada, esta última es la responsable de la formación de granulomas y de la presencia de BAAR en el esputo. Estos dos mecanismos son necesarios para controlar la infección por MTB y se encuentran alteradas en los pacientes VIH+. En consecuencia, los pacientes VIH/sida pueden tener abundante concentración bacilar en tejido pulmonar y pocos bacilos en el esputo²⁶. La densidad bacilar disminuye en proporción directa con el recuento de células T CD4+. El examen microscópico del esputo para BAAR puede ser menos sensible para el diagnóstico de TB en presencia de coinfección por el VIH, en particular en los pacientes con inmunosupresión grave. La baja sensibilidad del examen directo o baciloscopia, la presentación atípica de la TB en pacientes con enfermedad VIH/sida, y el alto porcentaje de transmisión en pacientes tuberculosos con BK-, hacen necesaria la búsqueda de exámenes más sensibles en la detección de TB²⁶⁻²⁸. El aumento del número de personas inmunodeprimidas por el VIH, los avances en los regímenes de quimioterapia, trasplante e inmunosupresión, y las mejoras en los métodos diagnósticos han llevado a un incremento de casos diagnosticados de infecciones provocadas por *Mycobacterium*, por esta razón es sumamente importante la aplicación de metodologías que logren acortar el diagnóstico, para de esta manera lograr el menor deterioro del paciente²⁹.

También debemos prestarle gran atención a las infecciones extrapulmonares ya que son de difícil diagnóstico debido a que son pausibacilares y la infección provoca deterioro en el organismo humano, sobre todo en los pacientes inmunocomprometidos. En pacientes sida con recuentos de linfocitos T-CD4 < 200 células/mm³ es muy común la infección diseminada, asociada a una gran mortalidad. La epidemiología de la infección en estos pacientes es muy variable en las poblaciones en dependencia de la eficacia de los Programas de Control de tuberculosis, la aplicación y adherencia a la Terapia Antirretroviral de Gran Actividad (TARGA), y la disponibilidad de tecnología médica^{27,30-33}.

Con respecto a los aislamientos de MNT estos resultados demuestran una vez más que las MNT toman cada día mayor importancia clínica-diagnóstica tanto en pacientes inmunocompetentes como pacientes inmunodeficientes. La infección pulmonar por MNT usualmente está asociada a algún tipo de inmunosupresión o a defectos estructurales pulmonares, para su diagnóstico se requiere además del cuadro clínico sugestivo, determinar el compromiso radiológico y el aislamiento microbiológico. Los criterios definidos por la Sociedad Americana del Tórax y la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (ATS/IDSA) deben ser aplicados en el diagnóstico de la enfermedad pulmonar por MNT. Sin embargo ante la dificultad del diagnóstico microbiológico el desarrollo de las pruebas de biología molecular ha ganado espacio y se consolidan como futuros métodos diagnósticos y deberán ser incluidos en los criterios diagnósticos de la infección por MNT^{34,35}.

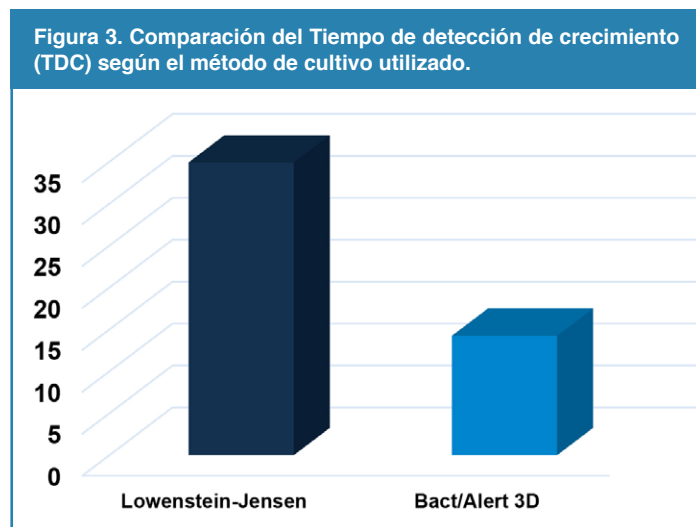
A continuación exponemos los resultados obtenidos al realizar la clasificación micobacteriana a los aislamientos de MNT detectados, según los grupos establecidos por Runyon (Figura 2).

Figura 2. Clasificación de especies micobacterianas no tuberculosas según clasificación de Runyon.



Las especies encontradas quedaron clasificadas: Grupo III (10); *M. triviale* (1), *M. terrae* (2), MAI (4), *M. xenopi* (1), *M. malmoense* (1), *M. nonchromogenicum* (1), Grupo II (6); *M. scrofulaceum* (4), *M. szulgai* (1), *M. gordonae* (1), Grupo IV (3); *M. fortuitum* (3). En la literatura se reporta a *Mycobacterium avium-intracellulare complex* y *Mycobacterium fortuitum complex* como las especies micobacterianas de mayor incidencia de aislamiento en humano, como se puede observar los resultados coinciden con los ya reportados^{16,17,21,25}.

Comparando el tiempo de detección de crecimiento (TDC) en ambas metodologías de cultivo se pudo observar; en la de cultivo automatizado en medio líquido además de poder detectar mayor cantidad de aislamientos, logra acortar el TDC parámetro muy importante específicamente para el género *Mycobacterium*, como se evidenció en nuestra investigación donde el TDC del Bact/Alert 3D y el cultivo en L-J fue de 14,23 y 34,91 días respectivamente; resultado estadísticamente significativo al obtenerse un valor de $p < 0,05$ (Figura 3).



Al analizar el TDC pudimos apreciar que para este indicador la diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,0000$), acortando el tiempo diagnóstico. Nuestros resultados son similares a los reportados por Martínez y colaboradores donde obtuvo un TDC 16,06 días en Bact/Alert y de 32,70 en medio sólido L-J. Alcaide y colaboradores en España, reportó un TDC de 15,90 días, sin embargo Parrish y colaboradores en similar estudio realizado en Baltimore, Estados Unidos, obtuvo para el equipo Bact/Alert 3D un TDC de 25,2 días^{8-10,35}.

Diversos estudios reportan una evaluación favorable del Bact/Alert 3D para el cultivo de micobacterias. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) recomienda el uso de cultivo combinado de medio de cultivo sólido y medio líquido, pues con el sistema automatizado se logra una rápida detección del crecimiento, pero no podemos observar morfología ni identificar especie^{7,8,36}.

En la **Tabla 3** aparecen los indicadores de desempeño. La sensibilidad, especificidad e índice de validez de la prueba fue de 90,91%, 95,08% y 94,48%, respectivamente. El índice de Youden fue de 0,86.

Tabla 3. Indicadores de desempeño del equipo Bact/Alert 3D vs L-J.

Indicadores	Valor (%)	IC (95%)	
Sensibilidad	90,91	81,28	100,00
Especificidad	95,08	92,28	97,88
Índice de validez	94,48	91,77	97,19
Valor predictivo +	75,47	62,94	88,00
Valor predictivo -	98,43	96,71	100,00
Índice de Youden	0,86	0,77	0,95
Tasa contaminación	7,76		

La sensibilidad detectada en este estudio es aceptable para el buen desempeño del cultivo automatizado, ya que en la literatura se reporta que los valores de sensibilidad para la prueba Bact/Alert 3D están entre el 78-99%⁷. Los resultados de sensibilidad obtenidos son superiores a los reportados por Martínez y colaboradores en 2014 (87,80%), los valores de especificidad si se encontraban un poco por debajo del valor estándar (97%), pero no representa una diferencia significativa. El valor del Índice de Youden refleja la diferencia entre la tasa de verdaderos positivos y la de falsos positivos ya que mientras más cercano a 1 mejor es la prueba diagnóstica que se está evaluando y se encuentra por encima del estándar (0,75), los resultados obtenidos son similares a los reportados recientemente^{9,10}.

A pesar de los avances tecnológicos en los ensayos disponibles en el mercado, y las ventajas que ofrecen los mismos para disminuir el tiempo de diagnóstico de las infecciones por micobacterias, el uso de las técnicas convencionales diagnósticas siguen jugando un rol muy importante en los laboratorios de Micobacteriología. El cultivo en L-J es la prueba de referencia y desempeña un papel importante para el diagnóstico y aislamiento de micobacterias a partir de muestras clínicas; a pesar de que la metodología del cultivo es laboriosa, y las colonias de micobacterias pueden tomar varias semanas para hacerse visibles en el medio de cultivo sólido, por ello ha sido necesario el desarrollo de estas técnicas automatizadas^{7,8,37}.

La Tasa de Contaminación (TC) obtenida por el equipo Bact/Alert 3D fue de 7,76%, estos resultados están dentro de los valores aceptados internacionalmente (8-9%) aunque otros autores plantean hasta el 7%. Las cifras obtenidas de la TC por el método convencional de L-J fue 7,80%, como se puede percibir son cifras muy similares y la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0,9252$)^{7,8}.

El equipo Bact/Alert 3D para el diagnóstico micobacteriano utiliza como medio de cultivo Middlebrook 7H-11, medio líquido rico en nutrientes que induce al crecimiento de otras bacterias y hongos que pudieran estar presentes en la muestra como parte de la microbiota normal, por esta razón los sistemas comerciales de cultivo utilizan antibióticos liofilizados reconstituidos para disminuir la contaminación bacteriana³⁸.

Lo anteriormente expuesto reafirma la importancia de la utilidad del sistema automatizado de cultivo en medio líquido Bact/Alert 3D en los Laboratorios de Micobacteriología para el diagnóstico micobacteriano. El acortamiento del tiempo de crecimiento es esencial para que el paciente pueda comenzar una oportuna y adecuada terapia para poder obtener el control efectivo de la infección, previniendo las peligrosas formas de diseminación que generalmente tienen graves consecuencias en particular en pacientes inmunodeficientes grupo poblacional de alto riesgo por su deterioro inmunológico.

Bibliografía

- Lugones, M, Ramírez, M. Pichs L. A., Miyar E. Apuntes históricos sobre la epidemiología, la clínica y la terapéutica de la tuberculosis en el mundo. *Rev Cub Hig Epidemiol.* 2007; 45 (2): 57-66.
- Onozaki, I., Raviglione M. Stopping tuberculosis in the 21st century: Goals and strategies. *Respirology.* 2010; 15: 32-43.
- Culquia, R., Rodríguez-Valínb E., Martínez M. V. Epidemiología de las hospitalizaciones por tuberculosis en España: análisis del conjunto mínimo básico de datos 1999-2009. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015; 33 (1): 9-15.
- Mederos, L. M., Fleites G., Capó V., De Armas Y., Acosta M. A., Montoro E. H. Infección diseminada por *Mycobacterium szulgai* con compromiso pulmonar y ganglionar en un paciente con sida. *Salud (i) Ciencia.* 2012; 18 (8): 776-80.
- Mederos, L. M., Reyes A., Rodríguez P., Váldez L., Sardiñas M., Martínez M. R., Díaz R. Coinfección por *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium tuberculosis* en paciente con el síndrome de inmunodeficiencia humana. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2014; 31 (4): 788-92.
- Handa, U., Mundi I., Mohan S. Review article on tuberculous lymphadenitis. *J Infect Dev Ctries.* 2012; 6: 6-12.
- Solorzano, A., Soria I., Roman J. Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples. *J Microbiol Biotechnol.* 2009; 19: 1259-64.
- Parrish, N., Dionne K., Sweeney A., Hedgepeth A., Carroll K. Differences in time to detection and recovery of *Mycobacterium* spp. between the MGIT 960 and Bact/Alert MB automated culture systems. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 63: 342-345.
- Martínez, M. R., Sardiñas M., García G., Mederos L. M., Díaz R. Evaluation of Bact/Alert 3D System for Mycobacteria Isolates. *J Tuberc Research.* 2014; 2: 59-64.
- Martínez M.R., Sardiñas M., García G., Mederos L. M., Díaz R. Nuevas herramientas para el diagnóstico de la tuberculosis. *Rev Cub Med Trop.* 2015; 67 (1): 41-9.
- Barrera, L. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía teórica. (2008) Parte II. Cultivo. INEI, ANLIS Dr. Carlos Malbrán. Argentina. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud.
- Bossio, J. C., Moral M. I., Arias S., Barrera L., Imaz S. Enfermedades Infecciosas. Tuberculosis. Diagnóstico de Tuberculosis. Guía para el equipo de Salud. (2009): Editado por Dirección de Epidemiología, Ministerio de Salud y Presidencia de la Nación, República de Buenos Aires, Argentina.
- Martin, A., Bombeek D., Mulders W., Fissette K., De Rijk P., Palomino J. C. Evaluation of the TB Ag MPT64 Rapid test for the identification of *Mycobacterium tuberculosis complex*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011; (5): 703-5.
- Gaillard, T., Fabre M., Martinaud C., Vong R., Brisou P., Soler C. Assessment of the SD Bioline Ag MPT64 Rapid™ and the MGIT™ TBc identification tests for the diagnosis of tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 70: 154-6.
- Runyon, E. Anonymous Mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin. North Am.* 1959; 43: 273-90.
- Brown-Elliott, B. A., Griffith D. E., Wallace R. J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Clin Lab Med.* 2002; 22: 911-25.
- Mederos, L. M., Sardiñas M., García G., Guerra J.C., Martínez M.R., Díaz R. Aspectos Clínicos y Aislamientos de Micobacterias Ambientales en Muestras Pulmonares y Extrapulmonares. *SIIC.* 2014; 21 (1): 35-9.
- Viera, A. J., Garrett J. M. Understanding inter observer agreement: the kappa statistic. *Farm Med.* 2005; 37 (5): 360-3.
- Panesar, J., Higgins K., Daya H., Forte V., Allen U. Nontuberculous Mycobacterial Cervical adenitis: a ten-years retrospective review. *The Laryngoscope.* 2003; 113: 149-54.
- Rojas, A., Lacruz H., Salinas P., Rangel D., Hernández M. Adenitis tuberculosa inguinal. Reporte de un caso. *Med ULA.* 2006; 15: 37-9.
- Mederos, L. M., Fleites G., Capó V., De Armas Y., Acosta M., Martínez M. E. H. Montoro Linfadenitis por *Mycobacterium* incluyendo pacientes infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana. *Arch Ven Farm y Terap.* 2011; 30: 54-7.
- Mederos, L. M., Blanco O., Fleites G., Acosta M. A., Castro O. Escrofulosis inguinal bilateral diseminada por *Mycobacterium avium-intracellulare* en paciente inmunocompetente. *Salud (i) Ciencia.* 2013; 20 (2): 304-6.
- Casal, M. Las micobacteriosis como enfermedad emergente. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2000; 18 (1): 55-8.
- Griffith, D., Aksamit T., Brown-Elliott B. A., Catanzaro A., Daley C., Gordin F. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *American Thoracic Society Documents.* *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 367-416.
- Mederos, L. M., Fleites G., Guerra J. C., Martínez M. R., Sardiñas M., García G., Díaz R. Importancia diagnóstica de las infecciones extrapulmonares causadas por el género *Mycobacterium*. *Rev Cub Med Trop.* 2015; 67(3). Disponible: <http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/101/102> Acceso: 11/6/2016.
- Martínez, M. R., García G., Sardiña M., Montoro E. H. Control de calidad de la baciloscopia de esputo BAAR en laboratorios provinciales en Cuba. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 2012; 50 (1): 29-36.
- Mederos, L. M. (2011). Infection for *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria in the HIV/AIDS patients. Part1, Chapter 1, pp. 3-21. *Global View of HIV Infection:* ed. Vishwanat Venketaraman.
- Iribarren, J. A., Rubio R., Aguirrebengoa K., Arribas J. R., Baraia-Etxaburu J., Gutiérrez F. Prevention and treatment of opportunistic infections and other coinfections in HIV-infected patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* Disponible: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.004> Acceso: 6/8/2016.
- Palomino, J. C. Current developments and future perspectives for TB diagnostics. *Future Microbiol.* 2012; 7: 59-71.
- Yong-Soo, K., Won-Jung K. Distinguishing between pulmonary tuberculosis and nontuberculous mycobacterial lung disease. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2015; 18 (6): 633.
- Dabó, H., Mineiro A., Carmelino J., Carvalho A., Gómez C. Tuberculosis de musculatura esquelética en una paciente inmunocompetente. *Arch Bronconeumol* 52(6). Disponible: <http://www.archbronconeumol.org/es/pdf/S0300289615003725/S300> Acceso: 5/5/2016.
- Detels, R., Tarwater P., Phair J. P, Margolick J., Riddler S. A., Muñoz A. The multicenter AIDS cohort study. Effectiveness of potent antiretroviral therapies on the incidence of opportunist infections before and after AIDS diagnosis. *AIDS.* 2001; 15: 347-55.
- Montúfara, F., Madrid A., Montufar M. C. Caracterización de pacientes hospitalizados con infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas, en un hospital de alta complejidad en Colombia. *Infectio.* 2014; 18 (4): 135-42.
- Díaz, R., Gómez R. I., Restrepo E., Rumbaut R., Sevy-Court J., Peláez O. Transmission of tuberculosis in Havana, Cuba; a molecular epidemiological study by IS6110 restriction fragment length polymorphism typing. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96: 437-43.
- Alcaide, F. New methods for mycobacteria identification. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006; 24 (1): 53-7.
- Baron, E. J., Miller J. M., Weinstein M. P., Richter S. S., Gilligan P. H., Thomson R. B. Jr. (2013). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *CID.* 57: 1-100.
- Alfa, M. J., Manickam K., Sepehri S., Sitter D., Lenton P. Evaluation of Bact/Alert 3D automated unit for detection of nontuberculous mycobacteria requiring incubation at 30 degrees C for optimal growth. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 2691-3.
- Garrigo, M., Aragón L. M., Alcaide F., Borrell S., Cardenosa E., Galan J. J. Multicenter laboratory evaluation of the MB/Bact *Mycobacterium* detection system and the BACTEC MGIT 960 system in comparison with the BACTEC 460TB system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 1766-70.