Bacterias que no toman la coloración de Gram – PARTE I

Mycobacterium

Un significativo número de las especies del género *Mycobacterium* son prominentes patógenos, como los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium leprae.* Además, numerosas especies de micobacterias del ambiente llamadas *Mycobacterium* no tuberculosos (MNT) (antes llamadas "micobacterias atípicas") son responsables por diversos tipos de enfermedades, especialmente en pacientes con infección por VIH-SIDA. Las micobacterias son objeto de estudio debido a su importantísima incidencia sobre la Salud Pública. Se conocen más de 70 especies de *Mycobacterium*, entre las que aparecen algunas especies de gran importancia médica como los agentes etiológicos de la tuberculosis humana y la lepra.

Características de las micobacterias

Morfología y tinción. Se trata de bacilos delgados, rectos o ligeramente curvos, inmóviles, que no presentan cápsula ni forman esporas. Aunque tienen la estructura de un Gram (+), las micobacterias casi no toman los colorantes de Gram a temperatura ambiente. Sin embargo, pueden teñirse con fucsina fenicada alcalina en caliente (coloración de Ziehl-Neelsen) y resisten la decoloración con ácido en medio alcohólico. Esta particularidad las define como ácido-alcohol resistentes. La resistencia a la decoloración se debe al elevado contenido lipídico de su pared celular y sólo se pone de manifiesto si las envolturas bacterianas permanecen intactas.

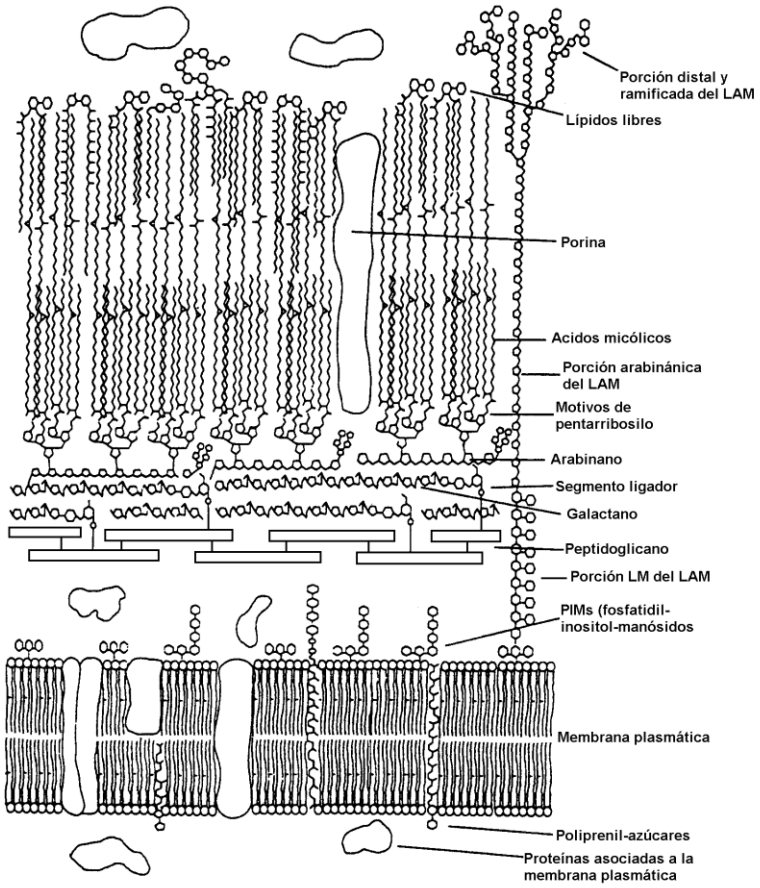

Figura 1. Esquema de las envolturas de *M. tuberculosis*

Estructura. La envoltura de las micobacterias consiste en una membrana citoplasmática y una pared celular. Esta última presenta una gran diferencia con la de los Gram (+), que radica en su elevado contenido de lípidos (60% del peso seco). La pared de las micobacterias contiene un grupo heterogéneo de peptidolípidos, glicolípidos fenólicos y sulfolípidos (sulfátidos), de acción significativa y específica en la patogénesis (Figura 1).

Metabolismo y cultivo. Los requerimientos nutricionales varían mucho de especie a especie de micobacteria. Como ejemplos extremos, algunas micobacterias no patógenas del ambiente pueden desarrollar en los picos de las canillas de agua y en lavatorios. Por el contrario, existen otras como *M. leprae*, que jamás pudo ser cultivada en medios artificiales. Las micobacterias son aerobias estrictas a punto tal que una leve disminución de la concentración de O_2 produce un marcado descenso del ritmo de crecimiento. *M. tuberculosis* desarrolla mejor en atmósfera de aire con 10% de CO_2. Las micobacterias crecen en medios sintéticos simples, pero para aislarlas de algunos materiales clínicos se requieren medios selectivos sólidos especialmente adaptados, que contienen no sólo los nutrientes, sino además inhibidores como el verde de malaquita y antibióticos, para evitar el crecimiento de la microbiota acompañante, que crece mucho más velozmente que las micobacterias.

Las micobacterias desarrollan muy lentamente y se requieren como mínimo de 10 a 20 días de cultivo a 37°C para que las colonias comiencen a hacerse visibles. Compárese su tiempo medio de generación de 15 a 20 horas, con el de la mayoría de las bacterias, que es de 30 o 40 minutos. Algunas pocas especies, como *M. fortuitum*, desarrollan más rápidamente (3 a 7 días para que una colonia se haga visible). Las micobacterias patógenas prácticamente no desarrollan a temperatura ambiente. En los cultivos de algunas micobacterias, como las del complejo *M. avium-intracellulare,* pueden observarse colonias rugosas (R, cepas virulentas) y lisas (S, avirulentas). *M. tuberculosis* forma colonias elevadas, verrugosas y adherentes, de color blanquecino o amarillento, difíciles de emulsificar debido a su alto contenido en lípidos. En ciertos medios de cultivo las cepas virulentas se agrupan en manojos paralelos formando largos cordones enroscados. Estos cordones también pueden ser observados en medios líquidos o en suspensiones preparadas en agua a partir de una colonia. Esta agrupación característica se debe a la presencia del factor cuerda.

El cultivo en medios semisólidos va cayendo en desuso en los laboratorios de Bacteriología. La mayoría de los laboratorios hospitalarios que realizan cultivos utilizan en la actualidad sistemas automatizados de monitoreo continuo. Mediante estos sistemas, las muestras se cultivan en medio líquido y puede detectarse la presencia de las micobacterias tuberculosas tras apenas 5 a 14 días de cultivo, dependiendo la densidad bacteriana en la muestra inicial. El agregado de un inhibidor del crecimiento del complejo *M. tuberculosis* (que incluye además de esta especie a *M. bovis* y *M. africanum*) a un frasco de cultivo paralelo, permite una identificación preliminar rápida. Los distintos sistemas disponibles se diferencian en el método de detección del crecimiento de las micobacterias. El sistema BACTEC 460TB utiliza en el medio de cultivo ácido palmítico marcado con ^{14}C y el instrumento detecta la producción de CO_2 radiactivo. Otros sistemas no utilizan radiactivos sino la detección de fluorescencia, como el BACTEC 9000MB o BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson) y el MB /BacT ALERT 3D (Biomerieux). Cualquiera de estos sistemas requiere la decontaminación de las muestras.

Resistencia a agentes físicos y químicos. A pesar de no formar esporas, las micobacterias son **altamente resistentes a la desecación** (12 años a 37°C en cultivos secos). Son sensibles en cultivo a la luz solar: 2 horas de exposición les ocasiona la muerte. En esputo pueden resistir de 20 a 30 horas de exposición solar y por 6-8 meses al abrigo de la luz solar. Las micobacterias pierden su viabilidad por pasteurización a 62°C por 30 minutos o 72°C por 16 segundos. Son resistentes a ácidos, álcalis y a la mayoría de los desinfectantes, excepto el formaldehído, el glutaraldehído, el fenol y sus derivados, el etanol al 70% y, en menor grado, los hipocloritos. Esta resistencia a agentes químicos, que se atribuye a la hidrofobicidad de sus envolturas, se aprovecha para la decontaminación de muestras para cultivo bacteriológico provenientes de materiales clínicos (esputo) que llevan consigo una considerable contaminación con otras bacterias.

Estructura antigénica. Las micobacterias poseen una estructura antigénica compleja. Los antígenos más estudiados son proteínas termoestables liberadas al medio de cultivo por *M. tuberculosis.* La preparación mejor conocida es la antigua tuberculina, que se obtuvo por ebullición de cultivos de 6 semanas de incubación. El PPD (Purified Protein Derivative, derivado proteico purificado) se obtiene al precipitar proteínas de *M. tuberculosis* con ácido tricloroacético o con sulfato de amonio de un filtrado de cultivo en medio sintético. El PPD contiene proteínas en la que predominan dos, de peso molecular 2.000 y 9.000 kDa. La purificación de los derivados hallados en filtrado de cultivo permitió la clasificación llamada "Estados Unidos-Japón", que incluye 11 antígenos: 1 y 2 son polisacáridos, 3 es un glucano de alto peso molecular, y de 4 a 11 son polipéptidos. Otros antígenos de *M. tuberculosis* son: i) polisacáridos, que no generan hipersensibilidad retardada; ii) fosfatidil-inositol-manósidos, de dudosa utilidad para el serodiagnóstico; iii) la cera D y el muramildipéptido, que son adyuvantes y que pueden además desencadenar la inmunidad adaptativa celular; y iv) dimicolato de 6,6'-trehalosa (factor cuerda), que posee actividad inmunorreactiva (adyuvante, inductor de granulomas, antitumoral y activador del sistema del complemento por la vía alterna). No se ha encontrado un antígeno único capaz de generar inmunidad protectora contra la infección tuberculosa ni que permita detectar la patología cuando se lo utiliza en una prueba serodiagnóstica.

Factores de patogenicidad. Los componentes celulares de *M. tuberculosis* son excepcionalmente poco tóxicos para huéspedes que no están previamente sensibilizados a la tuberculina. *M. tuberculosis* carece de endo y exotoxinas. La virulencia de la bacteria se asocia a su capacidad de multiplicarse dentro de los macrófagos a pesar de las condiciones hostiles que allí encuentra. Los principales determinantes de patogenicidad de *M. tuberculosis* y su mecanismo de acción se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales determinantes de patogenicidad de *Mycobacterium tuberculosis.*

Determinante	Principal mecanismo de acción
Factor cuerda	Es un estimulante de la respuesta inflamatoria. Debido a este factor, las micobacterias en cultivo se agrupan formado conglomerados que asemejan a una cuerda.
Lipoarábino-manano (LAM)	Se une a los receptores de manosa de los macrófagos (Mϕ) y promueve la penetración dentro de los mismos. Estimula la liberación de IL-8 que induce la quimiotaxis de granulocitos que contribuyen al daño de tejido. Inhibe la activación de los (Mϕ) por supresión de la proliferación de los linfocitos T.
Sulfátidos	Inhiben la fusión entre los lisosomas secundarios y los fagosomas y permiten la supervivencia de *M. tuberculosis* dentro de los Mϕ. Promueven la liberación de TNF-α, que induce daño celular y provoca ciertos signos en el enfermo (pérdida de peso).
Ureasa, arginasa, glutaminasa y asparaginasa	Producen la liberación de amoníaco, que alcaliniza el contenido fagolisosomal. Además, el amoníaco inhibe la fusión entre el fagosoma y los lisosomas. Así la micobacteria asegura su supervivencia intracelular.

LECTURA COMPLEMENTARIA

El texto que sigue permite la comprensión de la patogénesis de la tuberculosis humana.

Mycobacterium tuberculosis y la tuberculosis humana

La tuberculosis es una enfermedad crónica que puede abarcar toda la vida del individuo. Sus agentes etiológicos componen el complejo *M. tuberculosis*, que está integrado *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluyendo al *M. bovis* BCG)*, M. africanum, M. microti y M. canettii*. Este grupo presenta una homología de ADN-ADN mayor al 95%. Los estudios de secuenciación han mostrado que las

diferencias entre los genomas de *M. tuberculosis* y de las demás especies miembros del complejo radica en deleciones que han sufrido los genomas de estas últimas. Las enfermedades causadas por cualquiera de estas especies son indistinguibles entre sí. Aunque otras especies de *Mycobacterium* pueden ser comensales de distintos epitelios del cuerpo humano, *M. tuberculosis* es un patógeno primario y no existen portadores sanos: quien lo porta está necesariamente infectado. *M. tuberculosis* es el agente causal de la mayoría de los casos de tuberculosis humana en Argentina.

Breve reseña histórica. La tuberculosis se conoce desde la antigüedad y existe evidencia paleontológica que sugiere que la tuberculosis ya existía en la edad de piedra. Su naturaleza infecciosa fue establecida por Francoise Villemin alrededor de 1865 y Robert Koch en 1882 aisló en cultivo al agente etiológico. Al descubrirse los antibióticos y quimioterápicos en la década del 1940, la tuberculosis pareció poder controlarse en los países industrializados. La enfermedad, sin embargo, siguió siendo un problema sin solución en los países subdesarrollados. La coinfección con el VIH causó la re-emergencia de la tuberculosis en los países desarrollados y complicó aún más la situación en el resto del mundo.

Aspectos epidemiológicos. La tuberculosis es una enfermedad diseminada por los cinco continentes, y tiene particular importancia en los países no desarrollados. Se conocen diferencias raciales en la inmunidad contra el bacilo tuberculoso y se ha demostrado que están más expuestos al contagio los individuos con radicación urbana. Si bien la enfermedad posee una componente social significativa y afecta mayormente a individuos de los peldaños más bajos de la escala social, puede afirmarse que no hay sector de la sociedad que este exento del riesgo de contraerla.

Estadísticas recientes de la Organización Mundial de la Salud demuestran que la incidencia mundial de tuberculosis oscila entre los 8 y 12 millones de casos de tuberculosis activa por año, que la prevalencia (casos acumulados) supera los 20 millones y que las muertes alcanzan los 3 millones por año. Se estima que el 25 al 50% de la población mundial está "infectada" por el bacilo de la tuberculosis. Estar "infectado" significa que la persona ha albergado o alberga un bacilo del complejo *M. tuberculosis* y que, salvo excepciones, tiene reacción positiva la prueba de Mantoux.

Encuentro y penetración. La transmisión del bacilo tuberculoso ocurre más frecuentemente por vía aerógena, a través de microgotas que se producen y expelen al toser, estornudar o aún al hablar. Partículas con un diámetro de 1 a 5 μm pueden atravesar el tracto respiratorio superior, depositarse en el pulmón, e iniciar la infección. Una expectoración de un paciente con tuberculosis pulmonar activa (paciente bacilífero) puede generar hasta 3.000 microgotas infectantes y apenas 10 bacilos son capaces de iniciar la infección en un individuo susceptible. Las micobacterias pueden también causar infección al ingresar al huésped a través de microlesiones cutáneas. Esta puerta de entrada reviste importancia en la contaminación accidental con *M. tuberculosis* del personal médico, paramédico y de laboratorio, aunque la mayor parte de los casos de tuberculosis en los equipos de salud se da por transmisión aerógena. El personal que trabaja con bovinos también puede adquirir *M. bovis* al manejar animales infectados. Para medir la importancia de esta vía de contagio, valga mencionar que el 58,3% de los rodeos de bovinos en Argentina poseen animales con reacción positiva a la PPD y que el 4,3% del total de los bovinos de Argentina padecen la enfermedad. Otra puerta de entrada es la gastrointestinal, que cobra importancia cuando se ingieren las micobacterias presentes en materiales contaminados, como en utensilios de mesa, o cuando se consumen productos no pasteurizados derivados de bovinos enfermos.

Patogénesis.

La tuberculosis puede afectar a cualquier órgano, pero dado que la vía de ingreso más frecuente es la inhalatoria, la presentación más habitual de la enfermedad es la pulmonar. Los pasos involucrados en la patogénesis de la tuberculosis se presentan de manera muy simplificada en la Figura 2.

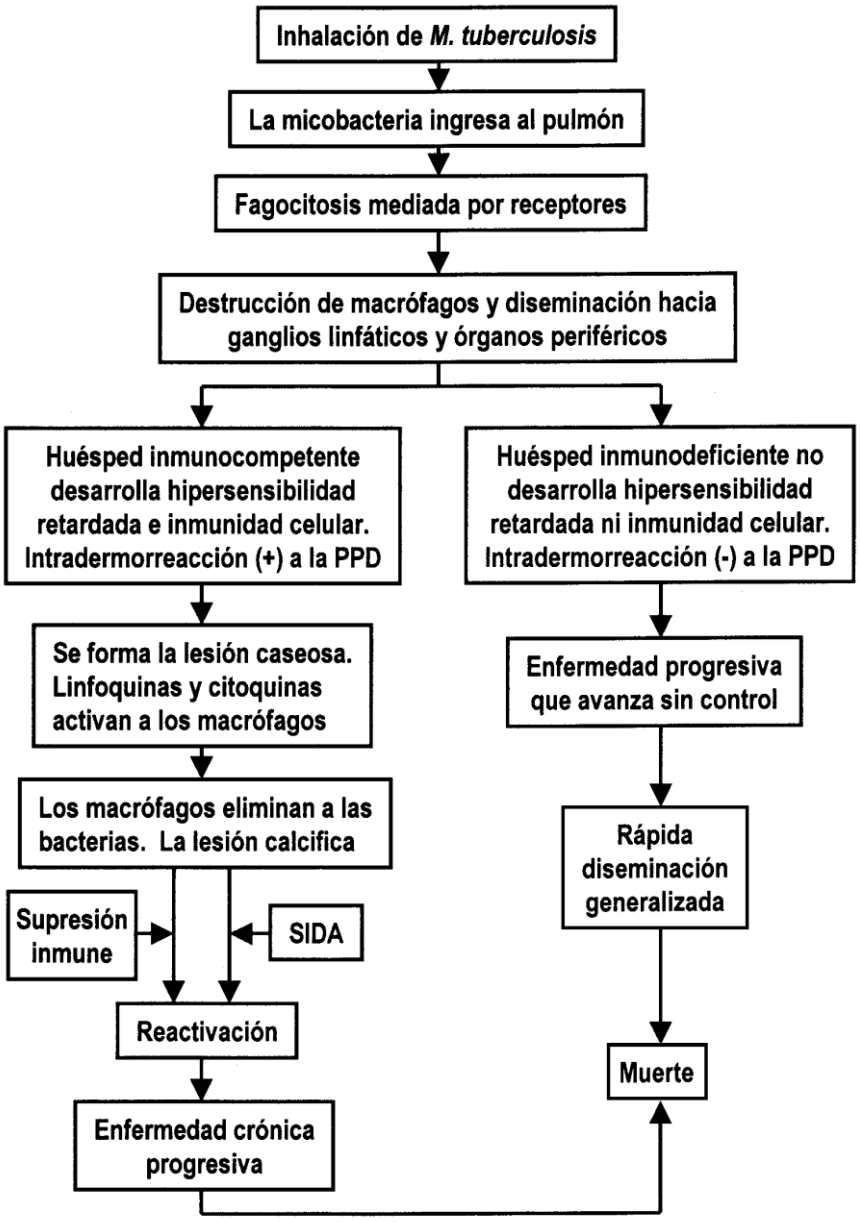

Figura 2 Patogénesis de la tuberculosis. Se describe la evolución de los casos extremos cuando la bacteria ingresa por primera vez a un huésped inmunocompetente o inmunodeficiente.

Primera etapa: establecimiento. Las micobacterias inhaladas transitan a través del tracto respiratorio superior y se depositan en el pulmón. Los macrófagos alveolares son las células que inicialmente fagocitan a las micobacterias en un proceso en que intervienen una variedad de receptores (Tabla 3).

Tabla 3. Receptores para componentes micobacterianos que promueven su adherencia e internalización por fagocitos profesionales y no profesionales del huésped.

Receptores	Ligandos y acción biológica
CR1, CR3, CR4	Involucrados en la endocitosis mediada por una opsonina (C3b). Para que C3b se forme, se necesita activación del C' por la vía alterna. Luego C3b se une a CR1. *M. tuberculosis* se puede unir también directamente a CR3 y CR4. La adherencia de *M. tuberculosis* a través de CR1 proporciona a la bacteria una supervivencia mayor que cuando se adhiere a través de CR3 o CR4. La expresión de los receptores CR está inhibida por IFN-γ. estimulada por PGE2, IL-4 y otras citoquinas liberadas por linfocitos Th2.
Receptor para manosa (MR)	Reconoce los residuos terminales de manosa sobre la micobacteria. Las micobacterias patógenas son fagocitadas por endocitosis mediada por MR (las atenuadas no). La endocitosis mediada por MR no estimula la producción de anión superóxido, necesario para la destrucción oxidativa de las micobacterias, y desencadena al mismo tiempo señales anti-inflamatorias. La expresión de MR está inhibida por IFN-γ. estimulada por PGE2, IL-4 y otras citoquinas liberadas por linfocitos Th2.
Receptores para la remoción de moléculas indeseables tipo A (scavenger)	Cuando la endocitosis vía CRs y MR son inhibidos, la endocitosis puede proceder por este mecanismo.
Receptores para colectinas	Las colectinas son un grupo de proteínas estructuralmente relacionadas, que incluyen a las proteínas del surfactante pulmonar (Sp-A), las lectinas de unión a manosa (MBLs) y C1q. Promueven la endocitosis de las micobacterias por macrófagos, neumocitos tipo II y neutrófilos. Los pacientes con infección por VIH tienen elevados niveles de Sp-A, lo que resulta en una adherencia tres veces mayor a los macrófagos estos pacientes. La endocitosis mediada por Sp-A suprime la producción de intermediarios reactivos del nitrógeno, necesarios para la inactivación y muerte de las micobacterias.
Fibronectina	Permite la unión a fagocitos no profesionales (células alveolares epiteliales) mediante la interacción con el integrantes del complejo antígeno 85, que es un miembro de la familia de proteínas de unión a fibronectina.
Glicoconjugados sulfatados	Permiten la unión a una adhesina para heparina producida por *M. tuberculosis.*

La estimulación de estos receptores induce la la fagocitosis de la micobacteria por macrófagos alveolares células dendríticas y fagocitos derivados de los monocitos circulantes que llegan al sitio de infección. Las células de la inmunidad innata del huésped poseen además otros receptores que reconocen diversos patrones presentes en las micobacterias. Estos son los receptores tipo Toll (TLR): el TLR2 reconoce lipoproteínas, el TLR4 reconoce lipoarábino-manano (LAM) y el TLR9 reconoce ADN bacteriano. El impacto de los respectivos ligandos bacterianos sobre estos receptores producen en general la liberación de citoquinas e interleuquinas proinflamatorias, especialmente IL-12. Los TLRs juegan un crucial papel en el reconocimiento innato de componentes micobacterianos en el estadío inicial de la tuberculosis.. Sin un repertorio íntegro de

TLRs funcionantes, no se produce la activación inmune de los fagocitos tras la internalización de las micobacterias.

Una vez fagocitadas, las micobacterias se alojan dentro de los fagosomas. Los sulfátidos de la envoltura bacteriana y el amoníaco producido por la bacteria impiden la fusión de los lisosomas con los fagosomas, por lo que las micobacterias no son atacadas y así pueden replicarse dentro de los fagosomas. Aunque eventualmente algunos lisosomas llegan a fusionarse con los fagosomas, la bacteria se protege del ataque de aquellos componentes oxidantes antibacterianos cambiando el pH intrafagolisosomal también por liberación de amoníaco.

La inmunidad innata del hombre contra *M. tuberculosis* se pone de manifiesto inicialmente en el sitio de infección a través de la actividad de un reducido número de células NK que arriban al sitio de infección. Estas actúan contra fagocitos que han internalizado micobacterias y que comienzan a expresar moléculas de superficie marcadoras de activación. Al entrar en contacto con estas moléculas de superficie, las células NK liberan IFN-γ que promueve la producción de óxido nítrico y TNF-α por los fagocitos (el óxido nítrico participa en la inactivación de *M. tuberculosis*). Pasados los 7 a 10 días desde el ingreso de la micobacteria al pulmón, lo que ocurra luego dependerá de las características de la cepa de *M. tuberculosis* infectante, del tamaño del inóculo y de la condición inmunitaria del huésped. Cepas poco virulentas, en un inóculo de escasa magnitud, normalmente son eliminadas en este estadío y la infección es abortada. Micobacterias de alta virulencia en un inóculo de mayor magnitud en un huésped susceptible (sin inmunidad adquirida contra la micobacteria) no pueden ser contenidas y el huésped no podrá detener la replicación intracelular de las micobacterias.

Segunda etapa: replicación intracelular. Pasados los 7 a 10 días, *M. tuberculosis* continúa su replicación intracelular evadiendo los mecanismos de defensa del huésped. Con el tiempo, algunos macrófagos se destruyen por acción de las células NK, ya sea por mecanismos de apoptosis o de citotoxicidad. Las micobacterias viables liberadas son recaptadas por otros macrófagos y por fagocitos derivados de monocitos. Estas células y linfocitos T comienzan a acumularse en el sitio de infección debido a la liberación de IL-8 y otros factores quimiotácticos liberados por macrófagos y fibroblastos. Como los macrófagos inicialmente no se activan, no pueden degradar a las micobacterias y tanto ellos como las células dendríticas fallan en la presentación antigénica. En esta etapa se produce una suerte de simbiosis entre las micobacterias y los fagocitos, en la que pocas células fagocíticas son dañadas y casi ninguna micobacteria es inactivada. El tamaño de la lesión continúa creciendo entre los 14 y los 21 días y las micobacterias continúan multiplicándose en fase logarítmica, casi sin inflamación ni daño manifiesto de tejido. El reconocimiento de productos micobacterianos por las células del huésped representa un paso crucial en el desencadenamiento de una respuesta efectiva. El reconocimiento inmune del LAM, se produce a través de la proteína plasmática de unión al LPS, que transfiere no sólo al LPS sino también al LAM al receptor celular de superficie CD14 sobre los monocitos y otros fagocitos, en presencia de TLR4 y de una proteína MD-2. Las concentraciones de tanto CD14 libre plasmático como de la proteína (lectina) plasmática de unión a LPS se encuentran elevadas en pacientes con tuberculosis activa.

Hacia el fin de la tercera semana de evolución de la infección, algunos macrófagos se activan en la lesión primaria incipiente y, junto con las células dendríticas, ejecutan la presentación de antígenos micobacterianos a los linfocitos T. Más quimiotactinas son liberadas y se observa una acumulación cada vez mayor de monocitos y linfocitos T en el sitio de infección.

Tercera etapa: diseminación. Un número de macrófagos activados se fusionan entre sí a través de moléculas de adhesión, como ICAM-1 y forman células multinucleadas gigantes. La formación de células multinucleadas representa visualmente una activa defensa del huésped

contra las micobacterias. Algunas micobacterias escapan del sitio inicial de infección y migran hacia los ganglios linfáticos regionales, donde son recaptadas por otros macrófagos. Vuelven a producirse en ese nuevo sitio ciclos de replicación micobacteriana y ruptura celular y, al cabo de un tiempo, algunas micobacterias pasan a circulación para luego ser capturadas por células fagocíticas tanto circulantes (monocitos) como de cualquier sitio del organismo. De esta manera, las micobacterias se diseminan, cuando todavía no se han generado niveles significativos de inmunidad adaptativa. En cada sitio donde unas pocas micobacterias se establecen, comienza a formarse una nueva lesión. El grado de evolución de las lesiones es independiente entre sí, debido a que los niveles de inmunidad adquirida son todavía muy bajos o inexistentes. Al cabo de 3 a 4 semanas desde el comienzo de la infección, ya existe un alto número de microlesiones en distinto estado de evolución, semejantes a la lesión inicial del sitio del inóculo.

En cada lesión, el reconocimiento de *M. tuberculosis* por las células fagocíticas va conduciendo lentamente hacia la activación celular y la producción de más citoquinas, que llevan a su vez a mayor activación celular y a la producción de aún mayores cantidades de citoquinas dentro de un complejo contexto regulatorio. Las cantidades relativas de estas citoquinas en el sitio de infección determinan la magnitud de la reacción inflamatoria y la ulterior evolución de la enfermedad tuberculosa. Un listado de las citoquinas proinflamatorias secretadas ante la presencia de *M. tuberculosis* y sus efectos se describen en la Tabla 4. La Tabla 5 describe las citoquinas anti-inflamatorias y la Tabla 6 las quimioquinas que intervienen en la infección tuberculosa.

Tabla 4. Principales citoquinas proinflamatorias y su acción en la infección tuberculosa.

Citoquina	Acción
TNF-α	Producida por monocitos, macrófagos y células dendríticas tras la estimulación con micobacterias o productos micobacterianos. TNF-α es una citoquina proinflamatoria que promueve la formación de granulomas, induce la activación de los macrófagos y posee propiedades inmunoregulatorias. TNF-α promueve la liberación de óxido nítrico y especies reactivas del oxígeno, con la subsecuente degradación oxidativa de las micobacterias. Esta citoquina se produce en el sitio de infección, pero desde allí se disemina al resto del organismo y causa efectos que abarcan a todo el individuo, como fiebre y pérdida de peso.
IL-1β	Importante citoquina proinflamatoria producida por monocitos, macrófagos y células dendríticas tras la estimulación con micobacterias o productos micobacterianos. Se produce en exceso en el sitio de infección.
IL-6	Posee propiedades pro- y anti-inflamatoria. Es producida en las fases tempranas de la infección tuberculosa. Inhibe la producción de TNF-α e IL-1β.
IL-12	Producida por las células fagocíticas aparentemente sólo tras la fagocitosis de la micobacteria tuberculosa. Juega un rol central en las defensas antituberculosas, pues sería una citoquina regulatoria que une la respuesta innata con la adaptativa contra las micobacterias.
IL-18	IL-18 comparte varias características con IL-1. Es inductora de IFN-γ y actúa sinérgicamente con IL-12. También estimula la producción de otras citoquinas proinflamatorias, quemoquinas y factores de transcripción. Juega un rol protector durante la infección tuberculosa.
IFN-γ	El rol protector de IFN-γ en la tuberculosis está bien establecido. La producción de IFN-γ por LTCD4 tras la interacción con antígenos micobacterianos específicos es un marcador de infección con la micobacteria tuberculosa. Antes que esta respuesta adaptativa se exprese, existen células que producen grandes cantidades de IFN-γ en ausencia de antígeno. La células NK producen IFN-γ por estimulación con IL-12 e IL-18. Los LT-$\gamma\delta$ pueden producir IFN-γ durante la infección tuberculosa temprana.

Tabla 5. Principales citoquinas anti-inflamatorias y su acción en la infección tuberculosa.

Citoquina	Acción
IL-10	Es producida por los macrófagos tras la fagocitosis de la micobacteria tuberculosa y el reconocimiento de LAM por su receptor específico. Los linfocitos T reactivos contra la micobacteria tuberculosa también pueden producir IL-10. IL-10 antagoniza la respuesta proinflamatoria regulando negativamente la producción de IFN-γ, TNF-α e IL-12. Al reducir los niveles de IL-12, interfiere con las defensas contra la micobacteria tuberculosa. Se observó una elevación de los niveles de IL-10 en pacientes tuberculosos anérgicos, lo que sugiere que IL-10 suprime la efectiva respuesta adaptativa.
TGFβ	El LAM induce la producción excesiva de TGFβ por monocitos y células dendríticas en el sitio de infección. TGFβ inhibe la proliferación de los LT y la producción de IFN-γ. En los macrófagos antagoniza la presentación antigénica, la producción de citoquinas proinflamatorias y la activación celular. Participa en la inducción de daño tisular al depositar de colagenasas y matriz de colágeno en el sitio de infección. Actúa sinérgicamente con IL-10.
IL-4	Inhibe la producción de IFN-γ por los macrófagos y la activación de estas células. La enfermedad tuberculosa progresiva y la reactivación de la tuberculosis se asocian a la elevación de los niveles de IL-4. Dicha elevación parece ser una consecuencia y no causa de la enfermedad tuberculosa.

Tabla 6. Principales quimioquinas que participan en la infección tuberculosa.

Quimioquina	Origen y acción
IL-8	Producida por macrófagos y células epiteliales pulmonares tras la estimulación con LAM o la fagocitosis de la micobacteria tuberculosa. Recluta neutrófilos, linfocitos T y quizás monocitos.
(MCP-1)	(Proteína quimiotáctica 1). Producida por monocitos y macrófagos. Recluta monocitos y macrófagos. La ausencia de MCP-1 lleva a la inhibición de la formación de granuloma.
RANTES	(Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted) Producida por una amplia variedad de células. Provoca la unión a diferentes receptores para quimioquinas.
¿Otras?	Se conoce una amplio número de quimioquinas de las familias CXC, CC, C y CX3C. Sin embargo, el papel de esas quimioquinas en la tuberculosis es controversial o desconocido.

Las micobacterias que llegan a la circulación más frecuentemente alcanzan la región apical pulmonar y en menor grado los riñones, áreas vasculares esqueléticas, epífisis óseas, sistema nervioso central y ganglios linfáticos, donde por último generarán focos metastásicos. Todas las lesiones progresan lenta pero irremediablemente, dado que durante las primeras semanas de la infección el huésped no vacunado literalmente carece de defensa específica contra la micobacteria tuberculosa. Hasta aquí el paciente puede permanecer asintomático o sólo sufrir síntomas leves no específicos.

Cuarta etapa: daño tisular. Al cabo de 4 a 6 semanas desde el ingreso de la micobacteria tuberculosa y cuando la masa de linfocitos en presencia del antígeno es suficientemente numerosa en el sitio donde la bacteria se replica activamente, comienzan a manifestarse los efectos de la inmunidad adquirida contra antígenos micobacterianos. A medida que la reacción inmune se hace más intensa, desde el punto de vista macroscópico, en el sitio de infección se producen zonas de necrosis central rodeadas de una corona de células mononucleares, a su vez rodeada de tejido fibroso inducido por otros factores liberados por los macrófagos activados. La lesión aumenta de tamaño, la región central se necrosa y forma un tubérculo blando característico. Este consiste en un granuloma de tamaño microscópico, ricos en macrófagos, linfocitos y células epitelioides. En el centro del tubérculo, se acumulan detritus celulares, micobacterias y productos de exudación, formando un contenido de color blanquecino, con apariencia de queso blando. De allí el nombre caseum que se da al material del tubérculo y de

necrosis caseosa al proceso por el cual tal material se forma. La lesión resultante es del tipo exudativo. La tensión de O_2 en la zona de necrosis caseosa es muy baja y el desarrollo de las micobacterias en ese sitio cesa. En otras palabras, en este período el huésped detiene en las lesiones avanzadas el crecimiento intracelular de la micobacteria tuberculosa a expensas de daño celular y liberación de las micobacterias hacia un medio extracelular poco propicio. En este período, la respuesta inmune contra los antígenos micobacterianos puede verificarse por la aparición de hipersensibilidad retardada a PPD (positivización de la reacción de Mantoux).

Inmunidad adaptativa contra *M. tuberculosis* La interacción entrela micobacteria tuberculosa y los distintos tipos celulares involucrados en la inmunidad innata contra el microorganismos es sumamente compleja. Una resultante de esta interacción compleja es la inducción de una respuesta adaptativa. La presentación de los antígenos micobacterianos por las moléculas de clase I y de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) determina respuestas por los LTCD4 y LTCD8, respectivamente. En la respuesta más temprana a los antígenos de la micobacteria tuberculosa en la lesión incipiente parecen intervenir una proporción significativa de células γ/δ. Esta respuesta parece dejar lugar posteriormente a una respuesta casi exclusiva de células α/β. La respuesta por LTCD8 es básicamente citotóxica, mientras que la respuesta por LTCD4 será cualitativamente diferente, de acuerdo a que las citoquinas presentes en el sitio de infección determinen una respuesta Th1 o Th2. El balance entre las respuestas Th1 y Th2 tiene crucial importancia, porque un desequilibrio en favor de una respuesta Th2 determina la aparición de fenómenos de hipersensibilidad, daño tisular y enfermedad.

La subpoblación Th1 libera grandes cantidades de citoquinas IFN-γ, IL-1β, IL-12 e IL-18) que producen la activación de los macrófagos por un lado y de las células T y las NK por otro lado. El efecto del IFN-γ sobre las células fagocíticas promueve la inactivación y degradación de las micobacterias intracelulares por acción de enzimas lisosomales y especies reactivas del O_2. Al mismo tiempo se inducen fenómenos de hipersensibilidad retardada por efecto de las citoquinas sobre las células T. Una activación descontrolada de los macrófagos sumada a la reacción de hipersensibilidad, puede resultar en un significativo daño de tejido. La subpoblación Th2 libera IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que proveen por un lado un efecto modulador (inhibitorio) de la respuesta Th1 y por otro lado un efecto estimulador de la diferenciación de las células B y la consecuente generación de anticuerpos, que no parecen tener relevancia en las defensas contra la micobacteria tuberculosa. La lisis de los macrófagos mediada por los LTCD8 citotóxicos desaloja a las micobacterias de su reservorio intracelular y las expone a los macrófagos activados. La suma de las acciones de los LTCD8 y de los LTCD4 Th1 frente a antígenos micobacterianos constituye la base de la eliminación de la infección, tanto del sitio inicial como de los sitios metastásicos.

La expresión patológica de la enfermedad depende de la cantidad de antígeno depositado y de la magnitud de la reacción de hipersensibilidad**.** Al respecto, se que los antígenos micobacterianos no sólo puede ser presentados por las moléculas de clase I y II del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) (respectivamente, vías endógena y endocítica) sino también por CD1. En especial, las moléculas CD1 son eficientes para la presentación de antígenos derivados de ácido micólico, fosfoinositolmanósido y lipoarábidomanano, entre otros. La activación de células T restringidas a CD1 conduce a la producción de IFN-γ y a citotoxicidad para macrófagos infectados. Recientemente se han descubierto que la micobacteria tuberculosa reduce la expresión de la molécula coestimulatoria B-7.1, afectando así la presentación antigénica.

Cuando la cantidad de antígeno en la lesión es pequeña, se establece una respuesta inmune celular limitada y la lesión generalmente es pequeña, circunscripta y organizada, integrada por células gigantes, macrófagos, linfocitos, fibroblastos y pequeños vasos. Se forma de esta

manera un granuloma. Esta respuesta es la más deseable y conduce a la limitación de la infección y cicatrización, con fibrosis, encapsulamiento y formación de una minúscula cicatriz. Al quedar la infección limitada por la respuesta inmune, generalmente se produce la calcificación del material caseoso. Las lesiones calcificadas en el sitio inicial de infección se pueden observar radiológicamente en una radiografía de tórax y el grupo de lesiones se reconoce como el complejo de Ghon. Se dice que el individuo que ha completado este ciclo patológico ha sufrido la primoinfección tuberculosa. Pero existe evidencia que las lesiones tuberculosas raramente se esterilizan y la micobacteria tuberculosa podría permanecer viable en el centro de la lesión calcificada en donde queda alojado suspendido en minúsculas masas de caseum. La permanencia de la micobacteria tuberculosa en el huésped explicaría la positividad de un alto número de individuos a la prueba de la tuberculina, a lo largo de varios años.

Los síntomas y signos de la primoinfección tuberculosa permanecen ausentes en el 90 % de los individuos, o se confunden con un estado gripal en el resto. En individuos, con inmunodeficiencia o alguna otra causa predisponente, se desarrolla en cambio la enfermedad clínica que puede progresar tanto en el sitio donde se produjo la lesión inicial como en cualquiera de los sitios metastásicos. Si la cantidad de antígeno en un sitio dado es grande y la reacción de hipersensibilidad tiene gran magnitud, la enfermedad se presenta clínicamente. Cuando esto ocurre, la lesión no se organiza, fracasa la formación de células gigantes y casi no se observan células epitelioides. Los muchos macrófagos y granulocitos que llegan al sitio de infección degeneran, se destruyen y median daño de tejido y necrosis, pero los macrófagos no se activan en presencia de los antígenos de *M. tuberculosis* y de esa manera son incapaces de destruir a la bacteria. La reacción inflamatoria en los sitios de infección se exacerba y conduce a la formación de la típica lesión macroscópica.

Si la infección, por el contrario, no queda limitada por la inmunidad celular, el tubérculo aumenta de tamaño y puede descargarse hacia la vía aérea. Cuando esto ocurre, el paciente puede expeler una gran masa de caseum bajo la forma de una vómica o expulsión del material semejando a un vómito. La descarga de caseum provoca la diseminación de las micobacterias a otras áreas sanas del pulmón (diseminación broncogénica). El vaciamiento del tubérculo deja en su lugar una cavidad tuberculosa con un alto número de micobacterias viables. Cuando el grado de hipersensibilidad es muy bajo, la reacción tisular es muy leve y no específica. Este caso se conoce como tuberculosis no reactiva. En un individuo vacunado o que ya ha sufrido la primoinfección tuberculosa, la movilización de células fagocíticas y linfocitos al área de inoculación inicial ocurre mas rápidamente**.** La presencia de muchos linfocitos que tienen memoria y reconocen al antígeno, y sumados a los macrófagos activados, limitan rápidamente la diseminación y multiplicación del bacilo tuberculoso.

En síntesis, la magnitud de las lesiones y el desenlace de la primoinfección depende mucho de la cantidad de antígeno presente y del equilibrio entre la reacción de hipersensibilidad (producida por mediadores de ambas respuestas de LTCD4 Th1 y Th2) y de la respuesta inmune celular protectiva (respuestas de LTCD8, LT CD4 Th1 y LT restringidas a CD1). De esta manera, la hipersensibilidad y la protección son dos caras de un mismo fenómeno, influido por una serie de factores que dependen cualitativa y cuantitativamente de la bacteria infectante y del huésped.

Reactivación de la enfermedad tuberculosa. Aproximadamente un 10% de los individuos con primoinfección tuberculosa e inmunidad normal desarrollan la tuberculosis en algún momento de su vida. En la mitad de ese 10% la enfermedad aparece dentro de los 5 años subsiguientes posiblemente como una continuidad a la primoinfección, mientras que la otra mitad lo hace más tarde en su vida. Cuando la enfermedad clínica aparece en la edad adulta, se la considera una reactivación de una infección tuberculosa pasada. Tal reactivación generalmente es endógena (la micobacteria tuberculosa ya estaba en el huésped, no es una reinfección con un bacilo nuevo) y

aparece con mayor frecuencia localizada en el pulmón. La reactivación se puede presentar hasta décadas después de la primoinfección. Se cree que focos latentes que mantienen a la bacteria viable constituyen un riesgo potencial durante la vida del individuo. La reactivación tuberculosa ocurre con mayor frecuencia en hombres de más de 50 años de edad. Se asocia a condiciones predisponentes que modifican transitoria o permanente el estado inmunológico del individuo, como diabetes, malnutrición, alcoholismo o estrés provocado por cambios significativos en la vida del individuo, como por ejemplo muerte del cónyuge.

La patogénesis de la reactivación de la infección tuberculosa es similar a la descripta para la primoinfección tuberculosa. En realidad, la primoinfección tuberculosa inaparente y la tuberculosis clínica son expresiones de un mismo fenómeno, sólo que cuantitativamente diferentes. La reactivación de la tuberculosis ocurre en sitios altamente oxigenados y con bajo drenaje linfático, como la porción apical pulmonar. Las lesiones confluyen y forman grandes áreas de necrosis y tubérculos con caseum. Posteriormente a la descarga de caseum, los vasos locales se erosionan y se produce sangrado, que resulta en la emisión de esputo sanguinolento (hemoptisis) y/o caseoso, con gran número de micobacterias. Las gotitas de Pflügge de estos pacientes son la principal causa de infección de otros individuos. La reactivación también puede ocurrir en riñón, hueso, ganglios linfáticos, cerebro, meninges, médula ósea e intestino. Los pacientes, en cada caso, presentarán un sindrome diferente de acuerdo al órgano afectado. La diseminación de la micobacteria tuberculosa a partir de un foco inicial puede llevar a la aparición de múltiples lesiones diseminadas, que caracterizan a la tuberculosis miliar.

***Mycobacterium* y SIDA.** En los últimos 20 años se ha observado que la tuberculosis es muy frecuente en individuos que sufren infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En la mayoría de los casos podría tratarse de una reactivación de la micobacteria tuberculosa que permanecía latente en el individuo y no de una nueva infección exógena. Si embargo se conocen casos de epidemias nosocomiales, en donde a partir de un individuo enfermo se han infectado los demás internados en la misma sala. Los individuos VIH-positivos sin expresión clínica o en las primeras etapas del SIDA generalmente desarrollan lesiones pulmonares con clara tendencia a la generalización. No debe descartarse que en algunos casos también puedan producirse reinfecciones con bacilos recientemente adquiridos.

Los signos característicos de la reactivación tuberculosa aparecen durante los primeros estadíos del SIDA, cuando aún pueden manifestarse fenómenos de hipersensibilidad que posibiliten la expresión de las lesiones características. Si el individuo infectado con el VIH ya ha alcanzado el estadío de inmunodeficiencia clínica severa, la micobacteria no podrá generar fenómenos de hipersensibilidad ni las lesiones tuberculosas típicas. En estos casos las micobacterias se diseminan rápidamente y causan una enfermedad sistémica que pueden llevar al paciente a la muerte en tan sólo 8 a 12 semanas. En estos casos, la enfermedad se confunde con aquella producida por micobacterias no-tuberculosas (ver más adelante en este capítulo).

La casuística local en individuos con SIDA muestra una alta incidencia de micobacteriosis producida por *Mycobacterium* no tuberculosos altamente resistentes a las drogas antituberculosas (según la especie que se trate, tienen sensibilidad a otros antibióticos de espectro más amplio). Las estadísticas muestran que en Buenos Aires cerca de la cuarta parte de los pacientes con SIDA sufren alguna patología causada por micobacterias y, entre ellos, el porcentaje debido a micobacterias no tuberculosas puede variar del 10 al 35% según la zona que se trate.

La reacción cutánea a la tuberculina. Cuando ocurre la infección tuberculosa se induce un fenómeno de hipersensibilidad retardada que puede ponerse de manifiesto a través la intradermorreacción a la tuberculina, prueba de Mantoux o prueba de PPD. En un principio se utilizaban para la prueba descripta por Mantoux preparaciones crudas de tuberculina, que dieron origen al nombre de la prueba. En la actualidad se utiliza una preparación estandarizada de PPD,

frente a un patrón de actividad conocida y su actividad se expresa en unidades de tuberculina (UT). Para el relevamiento poblacional en Argentina, la prueba comúnmente utiliza una potencia baja (2 UT), puesto que la gran mayoría de los individuos están vacunados y ya pueden presentar hipersensibilidad al antígeno. Si la reacción fue negativa para 2 UT, entonces se prueba con 20 UT. La prueba se realiza por inoculación intradérmica de 0,1 ml de una solución que contiene el PPD. La lectura del resultado debe hacerse entre las 48 y las 72 horas. Deben medirse el diámetro de las áreas de induración y de eritema en el sitio de la aplicación. Cuando se administra una dosis de 2 UT, un área de induración de más de 10 mm de diámetro acompañada de eritema se interpreta como resultado positivo. La interpretación cambia si se administran 20 UT, porque a tal dosis ocurren reacciones inespecíficas. En general la dosis de 20 UT sólo se utiliza para verificar si un individuo conserva alguna capacidad de respuesta (por ejemplo en el caso de un paciente inmunosuprimido).

El mecanismo de la prueba de la PPD puede interpretarse así: el antígeno tuberculínico provoca una débil reacción local, puesto que es atóxico. Los macrófagos tisulares procesan el antígeno que es reconocido por linfocitos que poseen memoria para ese antígeno. Se produce la liberación de factores quimiotácticos que reclutan más macrófagos y linfocitos de la circulación. Se produce la liberación de citoquinas por parte de los linfocitos activados, que producen cambios en la permeabilidad vascular. Se produce una inflamación local convencional, con todos sus componentes, que producen el eritema e induración.

Debe tenerse especial cuidado con la interpretación del resultado de la prueba. Una reacción positiva significa que el individuo está (o ha estado) infectado con *M. tuberculosis* o una micobacteria de otra especie, con la que tiene reactividad cruzada. La prueba no da una indicación temporal acerca de la infección, la que puede haber sido por ejemplo una primoinfección ocurrida muchos años antes. Una reacción puede dar un resultado negativo en los siguientes casos: i) cuando el individuo no está ni ha estado nunca infectado con una micobacteria del complejo *M. tuberculosis*; ii) cuando el individuo está infectado pero todavía no ha desarrollado hipersensibilidad retardada (estado de prehipersensibilidad); iii) cuando el individuo perdió la positividad de la reacción por esterilización del *M. tuberculosis* en antiguas lesiones iniciales; o iv) cuando el individuo se encuentra bajo enérgico tratamiento con esteroides o con drogas inmunosupresoras, o padece otras enfermedades como sarampión, que lo vuelven anérgico a la tuberculoproteína, o infección por VIH. En algunos casos también puede haber reacción negativa en pacientes con tuberculosis muy avanzada. Una reacción (+) débil (<10 mm) puede ser atribuida tanto a infección con *M. tuberculosis* como a reactividad cruzada con otra micobacteria causante de infección.

El valor clínico de la prueba de PPD depende de la incidencia de primoinfección en la población y del plan de vacunación infantil. En países desarrollados con baja incidencia de primoinfección y en donde no se vacuna a los niños, una reacción positiva en la infancia y la adolescencia tiene valor diagnóstico. En un país subdesarrollado, la gran incidencia de primoinfección en la niñez temprana le resta valor diagnóstico a la prueba. En Argentina, donde los individuos son vacunados dentro de los 30 días del nacimiento, el valor es aún menor. No obstante, la prueba tuberculínica mantiene cierto valor diagnóstico complementario, especialmente cuando la pápula es mayor de 10 mm de diámetro, en niños vacunados o no al nacer. La reacción positiva como resultado de la vacunación presenta un diámetro promedio menor a 10 mm. Una reacción positiva a la prueba con PPD siempre implica infección. En los casos en que esa infección puede con mayor probabilidad progresar hacia la enfermedad (en la niñez por lo inmaduro del sistema inmune, en los inmunosuprimidos por lo inerme de este sistema), el resultado (+) adquiere más valor. En estos casos se consideran dos alternativas: quimioprofilaxis (cuando no existe ninguna evidencia clínica de enfermedad) o tratamiento (si se detectan signos o síntomas).

En ciertos casos en Argentina se utiliza la quimioprofilaxis con isoniacida, por ejemplo, para: i) el niño menor de 5 años con reacción positiva a la PPD; ii) el niño con o sin reacción positiva a la PPD, que ha mantenido un estrecho contacto (cohabitado) con un individuo con reciente diagnóstico de tuberculosis (padre, madre, hermano, etc.); y iii) individuos con infección por VIH y reacción de Mantoux positiva, una vez que se descartó la tuberculosis tras una búsqueda exhaustiva. Los criterios para aplicación de la quimioprofilaxis preventiva varían de acuerdo a los países (población a la que el individuo pertenezca).

Métodos automatizados de monitoreo continuo. Si bien el cultivo en medios semisólidos puede seguir siendo un método recomendable, la mayoría de los laboratorios hospitalarios que realizan cultivos utilizan en la actualidad sistemas automatizados de monitoreo continuo. Mediante estos sistemas, las muestras se cultivan en medio líquido y puede detectarse la presencia de las micobacterias tuberculosas tras apenas 5 a 14 días de cultivo, dependiendo la densidad bacteriana en la muestra inicial. El agregado de un inhibidor del crecimiento del complejo *M. tuberculosis* (que incluye además de esta especie a *M. bovis* y *M. africanum*) a un frasco de cultivo paralelo, permite una identificación preliminar rápida. Los distintos sistemas disponibles se diferencian en el método de detección del crecimiento de las micobacterias. El sistema BACTEC 460TB utiliza en el medio de cultivo ácido palmítico marcado con ^{14}C y el instrumento detecta la producción de CO_2 radiactivo. Otros sistemas no utilizan radiactivos sino la detección de fluorescencia, como el BACTEC 9000MB o BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson) y el MB /BacT ALERT 3D (Biomerieux). El sistema ESP Culture System II (Trek Diagnostics System) detecta cambios de presión dentro del frasco de cultivo. Cualquiera de estos sistemas sigue requiriendo la decontaminación de las muestras. Si éstas provienen de sitios que poseen una flora normal, que contiene otras bacterias, levaduras u hongos del ambiente, se agregan antiomicóticos y antibióticos al frasco de cultivo. Si la muestra proviene de un sitio estéril (sangre, LCR, etc.), la muestra se siembra directamente en los frascos de cultivo especiales del sistema automatizado utilizado.

Métodos moleculares. La amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos por PCR o permite la identificación de la micobacteria tuberculosa en muestras provenientes de un cultivo automatizado o de colonias en medio semisólido. Existen diversos métodos comerciales ampliamente difundidos, como el ACCUProbe (GeneProbe Inc.) o el INNO-LiPA Mycobacteria (Innogenetics). Un método que ha demostrado buena sensibilidad es el de RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") que utiliza como sonda la secuencia de inserción 6110 (IS*6110*). Esta técnica se la considera el standard de oro ("gold standard").

También puede lograrse la detección de la micobacteria tuberculosa en muestras de pacientes por métodos de amplificación. El test directo para *Mycobacterium tuberculosis* AMTD-2 (Gen-Probe) y el método AMPLICOR MTB (Roche) utilizan sondas que amplifican una región del ARNr 16S y permiten la detección de la micobacteria tuberculosa con alta sensibilidad en corto tiempo. Para pacientes con baciloscopía (+), la positividad de los métodos moleculares supera el 95%, mientras que la del cultivo oscila entre el 70 y el 80%. La sensibilidad de la PCR en muestras con baciloscopía (-) oscila, según los estudios, entre el 44 y el 77%. Las pruebas de amplificación permiten reconocer la presencia de *M. tuberculosis* en una muestra clínica en cuestión de horas (6 a 8). Sin embargo quedan algunos problemas por resolver para extender el uso de los métodos de amplificación, como los falsos positivos por contaminación con minúsculas cantidades de ADN del ambiente del laboratorio.

Estos métodos pueden detectar la presencia de tan pocos como 1 bacilo en una muestra, lo que representa una ventaja en sensibilidad, comparado con los 10.000 bacilos necesarios para visualizar un bacilo mediante baciloscopía. Como el método de amplificación no requiere la

presencia de bacilos viables, ya que una prueba de amplificación de una muestra tomada de un paciente bajo tratamiento puede seguir dando positiva aunque las lesiones se hayan esterilizado.

La opinión de la mayoría de los expertos es que las pruebas de amplificación pueden complementar pero no debería reemplazar a los métodos tradicionales de diagnóstico. Una prueba de PCR es innecesaria cuando la sospecha clínica de tuberculosis es alta y la baciloscopía es (+), o cuando la sospecha clínica de tuberculosis es baja y la baciloscopía es (-). Sin embargo, se requiere ser muy criterioso cuando se encuentran resultados discordantes de baciloscopía y PCR. En conclusión, la PCR para *M. tuberculosis* es innecesaria en muchos, sino en la mayoría, de las situaciones clínicas. Una PCR no reemplaza una adecuada y criteriosa evaluación de la información clínica.

Otros métodos. Existe un método de hibridización para identificar la presencia de ADN micobacteriano en una muestra, utilizando sondas específicas de ADN complementario. Este método permite la identificación fehaciente en alrededor de 7 a 10 horas de *M. tuberculosis* a partir de aislamientos del bacilo por cultivo previo.

También existe un procedimiento de identificación de lípidos por cromatografía líquida de alta presión, que permite la diferenciación de las distintas especies. Este último método, sin embargo, requiere equipamiento costoso y exclusivo, que no está al alcance del laboratorio clínico convencional.

Si bien el huésped tuberculoso puede desarrollar una respuesta humoral contra *M. tuberculosis*, no existe un esquema práctico de serotipos basado en antígenos somáticos que permita el diagnóstico o la identificación de las micobacterias.

Otros *Mycobacterium* causantes de tuberculosis humana

Además de *M. tuberculosis*, la enfermedad puede ser causada por *M. bovis y por M. africanum, M. microti*, y *M. canettii,* aunque con mucha menor frecuencia. *M. bovis, M. africanum* y *M. microti* causan una enfermedad indistinguible de la causada por *M. tuberculosis*, aunque los primeros difieren en el aspecto epidemiológico. *M. bovis* no se transmite de un paciente a otro sino que se adquiere de otra fuente, como por ejemplo leche contaminada. *M. bovis* causa tuberculosis a bovinos y porcinos, pero sólo raramente causa infección al hombre. En Argentina, *M. bovis* causa en la actualidad alrededor del 1% de todos los casos de tuberculosis pulmonar. Los bovinos y los porcinos representan en Argentina un peligro potencial de infección por *M. bovis*, debido a la elevada tasa de infección de esos animales (más del 4% y cerca del 5% en bovinos y porcinos, respectivamente). La mayoría de los casos de tuberculosis causados por *M. bovis* aparecen en las provincias productoras lácteas (Córdoba, Buenos Aires y Santa Fe, en orden creciente). La tuberculosis causada por *M. africanum* sólo tiene alta prevalencia en el continente africano.

Micobacterias no-tuberculosas (MNT)

Las demás micobacterias causantes de enfermedad humana eran conocidas hasta hace poco como *Mycobacterium* **atípicos**, pero hoy día han sido clasificados con mayor precisión y cada uno ocupa un lugar propio en la taxonomía. El término "atípicas" aún se sigue usando la jerga médica, pero sería más correcto referirse a ellas como **micobacterias no tuberculosas**, en contraposición a las micobacterias tuberculosas, de las que deben diferenciarse en la clínica. Las MNT se hallan distribuidas mundialmente y para algunas de ellas parecen existir zonas endémicas. Se conocen reservorios animales para las MNT, pero la transmisión parece ocurrir más desde un reservorio ambiental que animal. El carácter endémico parece estar determinado

por la naturaleza de los suelos en donde se las encuentra, entre y otras características ambientales y climáticas.

La patogenicidad de las MNT es menor que las del complejo *M. tuberculosis*. Raramente se aíslan MNT de pacientes inmunocompetentes y, cuando esto ocurre, en la mayoría de los casos no tienen importancia clínica. Existen condiciones predisponentes como enfermedad pulmonar crónica (antracosis, neumoconiosis), inmunosupresión adquirida (SIDA) o inducida (tratamiento inmunosupresor) para que las MNT encuentren el campo propicio para causar enfermedad. Las MNT pueden causar infecciones pulmonares, que en algunos casos se confunden con la tuberculosis, pero que generalmente son progresivas y de más rápida evolución, justamente debido a que los pacientes que sufren infecciones por MNT son inmunodeficientes. El pronóstico de estas micobacteriosis generalmente es malo debido a las características de la enfermedad de base, que les impide a los pacientes montar una respuesta inmune adecuada, y a la elevada resistencia a los antibióticos y quimioterápicos que con frecuencia presentan las MNT. Ejemplos de estas micobacterias son *M. kansasii* y las que componen el complejo *avium-intracellulare*.

En un principio se pensó que el aislamiento de las MNT de materiales humanos era fortuito y que sólo se trataba de contaminantes. Sin embargo, hoy se sabe que se trata de patógenos que pueden causar no sólo graves infecciones sino también la muerte. Su transmisión no parece ser interhumana, sino que se adquieren directamente de reservorios ambientales o animales. Las infecciones causadas por las MNT pueden afectar diversos órganos, pero las localizaciones pulmonar, cutánea y ganglionar son las más frecuentes. En algunos casos, las MNT dan conversión de la reacción a la PPD, como ocurre en pacientes infectados con *M. kansasii*. En la mayoría de los casos, sin embargo, no existe reactividad cruzada medible entre *M. tuberculosis* y otras micobacterias en una prueba de PPD.