

Original

Susana García-De Cruz¹
Carmen Aldea-Mansilla¹
Ángel Campos-Bueno¹
Valentín Del Villar-Sordo²

Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. 20 años en la provincia de Soria. Rendimiento y oportunidades básicas de mejora

¹Laboratorio de Microbiología. Complejo Asistencial de Soria.

²Servicio de Medicina Interna. Complejo Asistencial de Soria.

Article history

Received: 23 November 2017; Revision Requested: 08 January 2018; Revision Received: 10 January 2018; Accepted: 02 February 2018

RESUMEN

Introducción. El objetivo del estudio fue conocer los datos relativos al diagnóstico microbiológico de la tuberculosis en la provincia de Soria, así como analizar la rentabilidad diagnóstica de las técnicas utilizadas y la utilización del laboratorio de microbiología en lo que concierne a la tuberculosis.

Métodos. Se diseñó un estudio observacional, descriptivo y retrospectivo, incluyendo todos los pacientes con tuberculosis de cualquier localización que tuviesen su residencia en la provincia de Soria. El periodo de estudio abarcó los casos diagnosticados entre 1994 y 2013 realizando seguimiento durante 24 meses tras el inicio del tratamiento.

Resultados. Se detectaron 337 pacientes durante el periodo estudiado. En más del 3% de los pacientes no se envió ninguna muestra al laboratorio de microbiología, porcentaje que ascendió al 23% en tuberculosis osteoarticulares y 33% en tuberculosis linfáticas. Se obtuvo confirmación microbiológica en el 80% y la baciloscopia fue positiva en el 32%. Las muestras se sembraron en medios sólidos y líquidos; el 10% de las cepas sólo se aislaron en un tipo de medio. El porcentaje de cepas resistentes a isoniazida fue de 2,9%, se detectó una cepa multirresistente (0,3%) y una cepa con resistencia únicamente a rifampicina (0,3%). De todos los pacientes bacilíferos con seguimiento, no se envió ninguna muestra para estudiar la negativización en el 36%.

Conclusión. Destaca la necesidad de mantener el cultivo combinado en medios líquidos y sólidos. Es necesario potenciar el uso del laboratorio de microbiología, enviando todas las posibles muestras diagnósticas y realizando controles bacteriológicos de seguimiento para objetivar la curación.

Palabras clave: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico, microbiología, baciloscopia, resistencia.

Microbiological diagnosis of tuberculosis. 20 years in the province of Soria. Performance and basic opportunities of improvement

ABSTRACT

Introduction. The aim of the study was to describe the bacteriological diagnosis of the tuberculosis in the province of Soria (Spain), as well as to analyse the techniques diagnostic performance and the use of the microbiology laboratory regarding tuberculosis.

Methods. An observational, descriptive and retrospective study was designed, including all patients with tuberculosis of any location that had their residence in the province of Soria. The period of study included patients diagnosed between 1994 and 2013 and a 24 months follow-up after the beginning of treatment was realized.

Results. A total of 337 patients were detected during the studied period. No sample was sent to the microbiology laboratory in more than 3% of the patients (23% in skeletal tuberculosis and 33% in lymphatic tuberculosis). Bacteriological confirmation was obtained in 80% and 32% were smear-positive. Specimens were culture on solid and in liquid media; 10% of the strains were only isolated in one type of media. There were 2.9% isoniazid-resistant strains, 0.3% multi-drug resistant strains, and 0.3% rifampicin-resistant strains. A total of 36% of smear-positive pulmonary tuberculosis patients had no specimens sent for a follow-up study.

Conclusion. It is essential to combine the use of a liquid and a solid medium. Physicians should be encouraged to submit specimens for mycobacteriological diagnostic and follow-up.

Key words: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, diagnosis, microbiology, smear microscopy, drug-resistance

Correspondencia:
Susana García-De Cruz
Laboratorio de Microbiología. Complejo Asistencial de Soria.
Calle Santa Bárbara s/n. 42005 Soria
Tfno: 975 23 43 00
E-mail: sgarciade@saludcastillayleon.es

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es la primera causa mundial de mortalidad en adultos producida por un agente infeccioso [1]. A nivel mundial, se estima que en 2015 hubo 10,4 millones de casos nuevos de tuberculosis, de los cuales en 480.000 se aislaron cepas multirresistentes (MDR) [1]. En la región europea de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estimó una incidencia de 323.000 casos siendo la región más afectada por la tuberculosis MDR. Dentro de esta región hay dos áreas claramente distintas, así en los países de fuera de la Unión Europea y Área Económica Europea (EU/EEA) el porcentaje de cepas MDR alcanzó el 21,6 %, sin embargo dentro de la EU/EEA el porcentaje de cepas MDR ha permanecido estable durante los últimos años con un 2,2%. En la EU/EEA la incidencia en 2015 fue de 65.000 casos (12,7 por 100.000 habitantes) y los casos confirmados microbiológicamente alcanzaron el 71,4% aunque con grandes diferencias entre países. En España las estimaciones para ese año son de 5.500 casos, aunque tan solo fueron notificados 4.191, de los cuales el 68% tenían confirmación microbiológica [2]. Los casos nuevos confirmados microbiológicamente presentaron en España un porcentaje de cepas MDR del 1,7% en 2014 sin una tendencia clara en los últimos años analizados [2].

El diagnóstico de confirmación de una tuberculosis se realiza por la detección del microorganismo en muestras del paciente. La baciloscopia es la forma más habitual de diagnóstico a nivel mundial, aunque el "gold standard" es el cultivo. Además, está aumentando el uso de técnicas rápidas de biología molecular [3]. En el 15-40% de los casos no puede establecerse una confirmación bacteriológica y el diagnóstico se basa en otros criterios [4-6]. Sin embargo, la confirmación microbiológica de la enfermedad es necesaria para obtener una identificación definitiva del bacilo y su antibiograma, de lo contrario se deberán utilizar tratamientos empíricos que se ven dificultados por el continuo aumento de resistencias a los fármacos antituberculosos. Las formas de enfermedad debidas a cepas MDR son uno de los mayores obstáculos para el control efectivo de la tuberculosis [7].

El objetivo del estudio fue conocer los datos relativos al diagnóstico microbiológico de la tuberculosis en la provincia de Soria, así como analizar la rentabilidad diagnóstica de las técnicas utilizadas y la utilización del laboratorio de microbiología por parte del resto de médicos en lo que concierne a la tuberculosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se diseñó un estudio observacional, descriptivo y retrospectivo. Se incluyeron en el estudio todos los pacientes con tuberculosis de cualquier localización que tuviesen su residencia, en el momento del diagnóstico, en la provincia de Soria, independientemente del tiempo que llevasen viviendo en ella. El periodo de estudio abarcó los casos diagnosticados de 1994 a 2013 y se realizó seguimiento durante 24 meses tras el inicio el tratamiento.

La detección de casos se realizó en tres registros: 1) la base de datos del laboratorio de microbiología del Complejo Asistencial de Soria, que centraliza el diagnóstico microbiológico de toda la provincia, 2) el registro del Conjunto Mínimo Básico de Datos (CMBD) de altas hospitalarias, incluyendo los códigos diagnósticos entre 010.00 y 018.96 de la Clasificación Internacional de Enfermedades 9ª revisión, Modificación Clínica (CIE-9-MC), que codifican tuberculosis activa de cualquier localización y 3) las encuestas de enfermedades de declaración obligatoria del Servicio Territorial de Sanidad y Bienestar Social. Se revisaron las historias clínicas de todos los pacientes detectados en estos tres registros y se consideró caso de tuberculosis aquel que cumplía los criterios de laboratorio y/o clínicos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) [8]. Se consultaron uno a uno todos los informes de muestras para estudio de micobacterias remitidas al laboratorio de microbiología de los pacientes incluidos en el estudio, tanto aquellas destinadas a realizar el diagnóstico como todas las correspondientes al seguimiento tras el inicio de tratamiento.

Diagnóstico microbiológico. En las solicitudes urgentes para estudio de micobacterias se realizó tinción de Ziehl-Neelsen directamente de la muestra que posteriormente se incluyó en el proceso habitual. Si la solicitud no era urgente las muestras se procesaron realizando decontaminación en las muestras no estériles, tinción de auramina y cultivo en medio de Löwenstein-Jensen y en Coletsos. Los cultivos se mantuvieron durante 8 semanas en estufa de 37°C con atmosfera normal durante los primeros años y a partir de diciembre de 1997 en estufa de CO₂. En abril de 1998 se incorporó un sistema de incubación automatizado en medio líquido, BacT ALERT clásico 240 de Organon, que se sustituyó en mayo de 2012 por el BacT ALERT 3D 240 de BioMerieux, ambos utilizan el medio líquido Middlebrook 7H9.

Las muestras se decontaminaron por 2 técnicas diferentes durante el periodo de estudio. Desde el año 1994 y hasta noviembre de 2003 se utilizó el método de Tacquet y Tison con lauril sulfato [9]. Dado que el tratamiento con lauril sulfato requiere la eliminación de los restos de este detergente para obtener mayor eficacia con medios líquidos, se añadió una modificación a la técnica, entre mayo de 1998 y noviembre de 2003, realizando 2 lavados adicionales con agua destilada del sedimento decontaminado de la muestra tras sembrar los medios sólidos. Posteriormente, la técnica del lauril sulfato fue sustituida por el método combinado de N-acetil cisteína con hidróxido de sodio (NaCl-NaOH) con el reactivo Mycoprep® de Becton Dickinson.

Las identificaciones definitivas de especie y estudios de antibiograma se realizaron en el Centro Nacional de Microbiología.

Se estudió la rentabilidad diagnóstica de las muestras considerando cada tipo de muestra sólo 1 vez por paciente.

Se agruparon bajo la denominación "casos con hallazgos microbiológicos" los casos con "confirmación microbiológica" (al menos uno de los siguientes: 1) Aislamiento en cultivo de

un microorganismo del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, salvo la cepa vacunal, en una muestra clínica. 2) Detección de ácido nucleico del complejo de *M. tuberculosis* en una muestra clínica junto con baciloscopia positiva por microscopía óptica convencional o fluorescente) y los casos con "probable confirmación microbiológica" (uno de los siguientes: 1) Baciloscopia positiva por microscopía óptica convencional o fluorescente. 2) Detección del ácido nucleico del complejo de *M. tuberculosis* en una muestra clínica) según criterios de la RENAVE [8].

RESULTADOS

Se detectaron 337 pacientes durante el periodo estudiado. De ellos se obtuvo confirmación microbiológica en 270 pacientes (80,1%). El 0,6% (2/337) de los pacientes se clasificaron como caso con probable confirmación microbiológica, por presentar únicamente baciloscopia positiva en un caso y detección de ácido desoxirribonucleico (ADN) en otro caso, sin aislamiento de la cepa en ninguno de ellos. Según la localización anatómica de la enfermedad se realizaron 359 diagnósticos ya que algunos pacientes presentaban enfermedad en dos localizaciones anatómicas distintas y el porcentaje de casos con hallazgos microbiológicos era bastante variable, siendo la enfermedad digestivo/peritoneal, la meníngea y la pericárdica las que presentaban menor porcentaje (tabla 1).

La baciloscopia fue positiva en 109 pacientes con tuberculosis de cualquier localización (32,3%). De acuerdo a la tinción en el esputo, 101 pacientes eran bacilíferos, lo que supone el 46,7% de los pacientes con tuberculosis pulmonar (92/197) y 30% de los pacientes con tuberculosis diseminada (9/30). En los pacientes coinfectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), el 40% de los esputos con crecimiento del bacilo (8/20) presentaron baciloscopia positiva, frente al 58,4% de los no coinfectados (62/106).

El 95,4% de los casos (188/197) de tuberculosis pulmonar se confirmaron por cultivo en alguna de las muestras recibidas, identificándose las cepas como *M. tuberculosis* en 183 pacientes y *M. bovis* en 5 pacientes. Uno de los jugos gástricos presentó bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) característicos en la tinción, lo que se consideró diagnóstico a pesar de que posteriormente no crecieron los cultivos.

En los pacientes con tuberculosis pleural el líquido pleural demostró crecimiento del bacilo en el 32% (17/53) y la biopsia pleural en el 64% (9/14). Tan solo en una muestra (1,4%), un líquido pleural, se visualizaron BAAR en la tinción. Todas las cepas se identificaron como *M. tuberculosis*.

Tabla 1 Casos de tuberculosis con hallazgos microbiológicos según la localización anatómica de la enfermedad.

	Casos de tuberculosis con hallazgos microbiológicos*	
Pulmonar	189 de 197	(95,93%)
Pleural	24 de 56	(42,85%)
Sistema nervioso central	3 de 9	(33,33%)
Digestivo/peritoneal	1 de 5	(20%)
Osteoarticular	7 de 13	(53,84%)
Genitourinario	14 de 16	(87,5%)
Piel y partes blandas	5 de 5	(100%)
Linfática	11 de 24	(45,83%)
Pericárdica	1 de 4	(25%)
Diseminada	25 de 30	(83,33%)

*Aislamiento en cultivo y/o baciloscopia positiva y/o detección de ADN

Tabla 2 Resistencia según la región de procedencia.

	Antibiograma		
	% tuberculosis sensible a todos los fármacos 1ª línea	% tuberculosis resistente a isoniazida	% tuberculosis multirresistente
Nativos	98,62 - (215/218)	0,91 - (2/218)	0
R. Africana	71,42 - (5/7)	28,57 - (2/7)	14,28 - (1/7)
R. de las Américas	95,65 - (22/23)	4,34 - (1/23)	0
R. Mediterránea Oriental	100 - (5/5)	0	0
R. Europea	66,66 - (6/9)	33,33 - (3/9)	0
R. del Pacífico Occidental	100 - (1/1)	0	0
Desconocido	100 - (4/4)	0	0

De los 13 pacientes con tuberculosis osteoarticular se recibieron muestras de 10 de ellos y 7 se confirmaron por cultivo, identificando en 5 casos *M. tuberculosis* y en 2 *M. bovis*.

En todos los pacientes finalmente diagnosticados con tuberculosis de piel y partes blandas se cursó algún tipo de muestra que confirmó el diagnóstico por cultivo, aunque no se visualizaron BAAR en las baciloscopias. Cuatro de las cepas de esta localización se identificaron como *M. tuberculosis* y 1 *M. bovis*.

De los 24 casos con diagnóstico de tuberculosis linfática no se recibió ninguna muestra para estudio microbiológico en 8 (33,3%) y sólo en 11 pacientes (68,7%) se obtuvo confirmación microbiológica por cultivo (8 casos *M. tuberculosis* y 3 *M. bovis*).

De todos los pacientes con tuberculosis diseminada se

obtuvo la confirmación microbiológica en el 80 % de ellos (23 pacientes con *M. tuberculosis*, 1 con *M. bovis*). Además otro paciente se clasificó como caso con probable confirmación microbiológica y solo se pudo identificar la cepa como *M. tuberculosis complex* al haberse realizado el diagnóstico por detección de ADN en LCR, sin que crecieran posteriormente los cultivos.

Los medios de cultivo mostraron resultados discordantes en el 10% de las cepas (27/270). Así, 10 cepas crecieron en medio líquido, pero no en medio sólido y 17 cepas sólo crecieron en medios sólidos, pero los medios líquidos fueron negativos.

Se realizó antibiograma en 267 cepas obteniendo un porcentaje de resistencia del 2,99% a isoniazida, 0,74% rifampicina, 1,87% estreptomycinina y 0% al etambutol. Entre ellas se identificó 1 cepa MDR, lo que supone un 0,3%. El porcentaje de cepas resistentes a isoniazida fue mayor en inmigrantes, 13,3% (6/45), que en nativos, 0,9% (2/218). También pertenecía a un paciente inmigrante la única cepa MDR. En la tabla 2 se detalla el perfil de sensibilidad de las cepas según la región de origen de los pacientes.

Siguiendo estrictamente la definición de curación [1], que precisa objetivar la negativización del cultivo en 1 muestra tomada al final del tratamiento y, como mínimo, en otra muestra tomada en otra ocasión previa, tan sólo el 14,4% de los pacientes con confirmación microbiológica (39/270) lo cumplen. Este dato asciende al 16,5% si sólo consideramos aquellos pacientes con afectación pulmonar (35/211), en los que realizar muestras de seguimiento es más sencillo. Las premisas de ser un caso con afectación pulmonar confirmado microbiológicamente y haber completado el tratamiento en la provincia se cumplían en 143 pacientes, de ellos tan sólo en el 24,4% se habían realizado los controles adecuados para poder ser clasificados como curados o no según los criterios de la OMS. En otro 34,2% se había objetivado conversión bacteriológica en alguna muestra al principio del tratamiento, aunque no al final, pero en el 41,2% no se comprobó la negativización de la baciloscopia o del cultivo con ninguna muestra, a pesar de que el 50,8% de ellos (30/59) eran bacilíferos y, por lo tanto, más contagiosos. De todos los pacientes bacilíferos con seguimiento, no se envió ninguna muestra para estudiar la negativización en el 36,7% (29/79).

DISCUSIÓN

El 95,4% de las tuberculosis pulmonares presentaron confirmación microbiológica. Cifras tan elevadas se observaron también en la localización genitourinaria y en la de piel y partes blandas, donde el 87,5% y 100% respectivamente de los casos estaban confirmados, probablemente porque el diagnóstico e inicio de tratamiento en estas localizaciones no se hizo en ninguna ocasión solo con criterios clínicos. De hecho, la mayoría de los pacientes con tuberculosis genitourinaria o de piel y partes blandas llevaba meses de estudio hasta que finalmente creció el bacilo en algún cultivo.

Respecto a la rentabilidad diagnóstica de los estudios de tuberculosis de nuestro laboratorio los mejores resultados se obtuvieron en muestras de esputo y orina. Se ha estudiado la rentabilidad diagnóstica de acuerdo a estudios solicitados sólo en los pacientes con enfermedad tuberculosa incluidos en el estudio, por ello la biopsia endometrial o la de piel y partes blandas resultaron siempre diagnósticas, ya que fue precisamente este resultado el que condicionó el diagnóstico. Es de esperar, sin embargo, que su rentabilidad no sea tan buena, ya que la sensibilidad de la baciloscopia y el cultivo es baja en las localizaciones anatómicas extrapulmonares al ser formas paucibacilares [10]. Estudiar la rentabilidad de acuerdo a todas las veces que se realizó estudio de micobacterias sobre una determinada muestra tampoco aportaría datos más fiables, ya que muchas veces se rellena la petición sin que haya una sospecha consistente de enfermedad tuberculosa, por lo que probablemente el número de solicitudes respecto a los cultivos positivos resultaría muy sobredimensionado.

Lo más llamativo del análisis de las muestras procesadas es que varias de las extraídas con procedimientos invasivos no se enviaron al laboratorio de microbiología y sólo se enviaron a anatomía patológica. Esto sucedió en el 23% de las tuberculosis osteoarticulares (3/13) y en el 33,3% de las tuberculosis linfáticas (8/24), que finalmente basaron su diagnóstico en los hallazgos anatomopatológicos y realizaron tratamiento sin tener confirmación del microorganismo o realizar estudios de sensibilidad. Esta situación supone un gran perjuicio para el paciente por lo que consideramos necesario realizar charlas de concienciación para que, desde los quirófanos, no se tienda a introducir por rutina las piezas en formol y se envíen fragmentos de este tipo de muestras a ambos laboratorios. Aún así, el porcentaje de casos confirmados microbiológicamente en nuestra provincia supera ampliamente los datos nacionales [2], además debemos de tener en cuenta que los datos nacionales se refieren a casos notificados y precisamente no tener confirmación microbiológica conlleva más infranotificación [11], por lo que las discrepancias podrían ser mayores.

Las recomendaciones respecto a los medios de cultivo a utilizar incluyen el uso combinado de medios líquidos y medios sólidos [12], aunque no todos los laboratorios siguen estas recomendaciones. En nuestro estudio, de haber utilizado sólo medios líquidos, se habrían perdido 17 cepas (6,29%) aunque buena parte de esas pérdidas (13 cepas) pueden achacarse a la utilización, desde la introducción de los medios líquidos en el laboratorio en 1998, hasta noviembre de 2003, de un método de descontaminación no compatible con el medio líquido de cultivo [13]. De haber utilizado sólo medios sólidos, se habrían escapado el 3,7% de las cepas (10/270).

El criterio del laboratorio ha sido siempre realizar estudio de resistencias a todas las cepas aisladas, tal y como recomienda la OMS en todos los países con recursos elevados [14]. Sin embargo, en Castilla y León en más del 12% de las cepas aisladas no consta que se realizase antibiograma en 2013 [15]. Dentro de nuestro estudio tenemos 3 cepas que no fueron aisladas en nuestro laboratorio y de las que no se dispone de información acerca de si se realizó antibiograma

o no, ya que este dato no figuraba en la historia clínica. Esta situación, que ha resultado ser poco frecuente en Soria, puede que suponga un mayor porcentaje de casos en provincias más grandes, donde se realicen más estudios en mutuas o centros privados, con la consiguiente pérdida de información.

Uno de los datos más llamativos es el elevado porcentaje de pacientes en los que no se estudió la negativización de las tinciones y del cultivo a pesar de ser bacilíferos (36,7%) y acudir a las revisiones médicas. Habitualmente esta situación se produce cuando el paciente, una vez en tratamiento, deja de expectorar. Sin embargo, debería realizarse de todos modos una indicación de estudio de esputo y alentar a los clínicos y a los pacientes en este sentido.

Para concluir consideramos que es necesario potenciar el uso del laboratorio de microbiología, enviando todas las posibles muestras diagnósticas sobre todo aquellas obtenidas con técnicas invasivas y realizando, sistemáticamente, controles bacteriológicos de seguimiento para objetivar la curación.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. Ginebra: WHO Press; 2016.
- European Centre for Disease Prevention and Control. WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2017. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2017.
- Alcaide F. Diagnóstico microbiológico actual de la tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017; 35 (7): 399-402. PMID: 28683863.
- Bernardo J. Diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV-uninfected patients. [Monografía en internet]. Waltham (MA): UpToDate; 2015 [acceso 12 de mayo de 2015]. Disponible en: <http://www.uptodate.com/>.
- Taylor Z, Marks SM, Ríos Burrows NM, Weis SE, Stricof RL, Miller B. Causes and costs of hospitalization of tuberculosis patients in the United States. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000; 4 (10): 931-9. PMID: 11055760.
- Centers for Disease Control and Prevention. Reported tuberculosis in the United States, 2013. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2014.
- Alcaide F, Coll P. Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29 Supl 1: 34-40. PMID: 21420565.
- Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Protocolos de Enfermedades de Declaración Obligatoria. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2013.
- Ortega A, March J. Manual de técnicas en micobacteriología. Madrid: Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias. Centro Nacional de Microbiología.
- García JF. Formas extrapulmonares de la tuberculosis: situación en un nuevo siglo. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008; 26 (9): 537-9. PMID: 19100171.
- Morales-García C, Rodrigo T, García-Clemente MM, Muñoz A, Bermúdez P, Casas F et al. Working Group on Under-reporting of Tuberculosis in Spain. Factors associated with unreported tuberculosis cases in Spanish hospitals. *BMC Infect Dis.* 2015; 15 (1): 295. PMID: 26220420.
- González-Martín J, García-García JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R et al. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28 (5): 297.e1-e20. PMID: 20435388.
- Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P. Pretreatment of clinical specimens with sodium dodecyl (lauryl) sulfate is not suitable for the mycobacteria growth Indicator tube cultivation method. *J Clin Microbiol.* 1997; 35 (8): 2142-44. PMID: 9230399.
- Schwoebel V, Lambregts-van Weezenbeek CS, Moro ML, Drobniowski F, Hoffner SE et al. Standardization of antituberculosis drug resistance surveillance in Europe. Recommendations of a World Health Organization (WHO) and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) Working Group. *Eur Respir J.* 2000; 16 (2): 364-71. PMID: 10968516.
- Servicio de Epidemiología. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Informe Epidemiológico sobre la Tuberculosis en Castilla y León. Año 2013. Valladolid: Junta de Castilla y León; 2014.