

## Contaminación cruzada por *Mycobacterium tuberculosis* en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis de Cuba

### Cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* at the National Reference Laboratory of Tuberculosis of Cuba

María Rosarys Martínez Romero, Misleidis Sardiña Aragón, Grechen García León, Lilian María Mederos Cuervo, Giselle Freyre Corrales, Raúl Díaz Rodríguez

Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

**Introducción:** la contaminación cruzada por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) en el laboratorio es más común de lo que se piensa.

**Objetivo:** confirmar un posible episodio de contaminación cruzada por *Mtb* en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias del Instituto "Pedro Kouri".

**Métodos:** se realizó un estudio descriptivo y retrospectivo de los indicadores de calidad del cultivo del 3er trimestre de 2014. Se observó un incremento de cultivos positivos a *Mtb* con codificaciones bajas, durante un día de trabajo. Se encontraron 10 aislamientos de 19 muestras procesadas: ocho con sospecha de contaminación cruzada y dos aislamientos pertenecientes a uno de los pacientes involucrados y que tuvo un cultivo positivo procesado en una fecha diferente. Las muestras se procesaron según lo establecido por el Programa Nacional de Control de la Tuberculosis de Cuba. A los cultivos positivos se les realizó la tipificación con oligonucleótidos espaciadores *Spoligotyping*.

**Resultados:** el aislamiento de la muestra 1 435 (paciente 1) fue un patrón único al no aparecer en la base de datos internacional SITVIT2. En los cultivos de las muestras 1 438 y 1 439 (paciente 2) se identificó el linaje Beijing (tipo 1). En los siete cultivos restantes (pacientes del 3 al 7) se identificó el linaje S tipo 71; los cultivos posteriores de estos pacientes fueron negativos a excepción del paciente 5 (muestra 1 561), en el que se aisló *Mtb* con el mismo patrón genético.

**Conclusiones:** los resultados de la genotipificación permitieron confirmar los cultivos positivos contaminados e inferir una posible fuente de contaminación durante ese día de trabajo. También resalta la importancia de identificar eventos de contaminación cruzada, pues puede implicar un mal manejo clínico de los pacientes, así como el uso innecesario de un tratamiento largo y costoso, además de influir en el análisis e interpretación de los resultados desde el punto de vista epidemiológico.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*; contaminación cruzada; Spoligotyping.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** cross contamination of *Mycobacterium tuberculosis* in the laboratory is more common than thought.

**Objective:** to confirm a possible event of cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* in the National Reference Laboratory of Tuberculosis, Leprosy and *Mycobacteria* of "Pedro Kouri" Institute.

**Methods:** a descriptive and retrospective study of quality indicators of culture for the third quarter of 2014 was conducted. An increased *Mycobacterium tuberculosis*-positive culture with low encodings was observed during a working day. Ten isolates of 19 processed samples were found: eight suspected cross-contamination and two isolates from one of the patients involved and had a positive culture processed on a different date. The samples were processed as established by the National Program for Tuberculosis Control in Cuba. Positive cultures were typed by using oligonucleotide spacers Spoligotyping.

**Results:** the isolation of the sample 1 435 (patient 1) showed a unique pattern that does not appear in the international database SITVIT2. In the culturing of 1 438 and 1 439 samples (patient 2), the Beijing lineage (type 1) was identified. In the remaining seven cultures (patients 3 through 7), the lineage S type 71 was identified. The subsequent cultures of the samples taken from these patients were negative except for patient 5 (sample 1 561) in whom *Mtb* was isolated with the same genetic pattern.

**Conclusions:** the results of genotyping allowed confirming the contaminated positive cultures and inferring a possible source of contamination during that workday. It also highlights the importance of identifying cross-contamination events, because it may involve poor clinical management of patients and thus the unnecessary use of a long and costly treatment, in addition to influencing the analysis and interpretation of the results from the epidemiological viewpoint.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*; cross-contamination; Spoligotyping.

---

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es considerada la primera causa de morbilidad y mortalidad dentro de las enfermedades transmisibles. La Organización Mundial de Salud en 2014, reportó que 6 millones de personas enfermaron de TB, en el que 12 % de los

---

casos nuevos fueron VIH; se produjeron 1,5 millones de muertes, entre ellos 0,4 millones pacientes VIH.<sup>1</sup>

A pesar de los adelantos en el campo de la micobacteriología, ningún método de última generación ha desplazado el cultivo como técnica de referencia para el aislamiento de las micobacterias.<sup>2</sup> Este incluye una serie de pasos complejos que van desde la obtención adecuada de la muestra hasta la identificación final del agente etiológico. Existe la probabilidad que durante alguno de estos pasos se produzca una contaminación cruzada por la transferencia accidental de bacilos de una muestra altamente positiva a otras procesadas subsecuentemente; también puede ocurrir durante la toma de muestra del paciente, el proceso de la microscopia o la inoculación de muestras. La mayoría de las veces, estos errores pueden generar uno o más resultados falsos positivos del cultivo y, en ocasiones, puede pasar inadvertido en la rutina de trabajo.<sup>3,4</sup> Por otro lado, los bacilos tienen la capacidad de sobrevivir fuera del huésped por largos períodos. Se han podido recuperar bacilos tuberculosos viables de frotis fijados después de aplicar calor y a partir de soluciones de descontaminación (como el cloruro de sodio al 0,9 %) hasta 3 semanas después de la inoculación.<sup>5</sup>

El fenómeno de la contaminación cruzada por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) en el laboratorio es más común de lo que se piensa: puede ocurrir en alrededor de 3 % de los casos; aunque hay autores que reportan hasta 10 %.<sup>5</sup> Esta debe sospecharse si *Mtb* es identificado en una sola muestra de una serie de especímenes de un paciente cuando la codificación del cultivo es baja, si la muestra positiva con sospecha de contaminación cruzada se ha procesado junto (o en un corto período) con otra de un paciente con una alta carga bacteriana.<sup>6</sup> La confirmación definitiva de la falsa positividad requiere de la aplicación de herramientas moleculares para demostrar que los aislamientos de *Mtb* identificados, con sospecha de posible contaminación cruzada, comparten patrones genotípicos idénticos, después de haber descartado vínculos epidemiológicos entre los casos involucrados.

Al realizar el análisis en el laboratorio de los indicadores del cultivo (análisis mensual de los resultados del cultivo y % de baciloscopia negativa con cultivo positivo) del medio Löwenstein Jensen (LJ), pertenecientes al trimestre julio-septiembre de 2014, se observó un aumento inusual de cultivos positivos a *Mtb* (en un día de trabajo), la mayoría de ellos con codificaciones bajas, lo que alertó de la posibilidad de una contaminación cruzada. El objetivo de este trabajo fue confirmar un posible episodio de contaminación cruzada en el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRITLM) del Instituto "Pedro Kourí" (IPK), La Habana, Cuba.

## MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo. Durante el análisis retrospectivo de los indicadores de calidad del cultivo del 3er trimestre de 2014, se observó un incremento de cultivos positivos a *Mtb* con codificaciones bajas, durante un día de trabajo (24 de julio). En total, se encontraron 10 aislamientos (tabla) de 19 muestras procesadas ese día: ocho con sospecha de posible contaminación cruzada (de seis casos) y dos aislamientos pertenecientes a uno de los pacientes involucrados (posible fuente de infección) y que tuvo un cultivo positivo procesado en una fecha diferente (3ra muestra del paciente). Las muestras se trabajaron según lo establecido en las normas de procedimientos del Programa Nacional de

Control de la Tuberculosis de Cuba.<sup>7</sup> A todos los cultivos positivos (procesados el 24 de julio de 2016) se les realizó la tipificación con oligonucleótidos espaciadores (*Spoligotyping*, en inglés).

#### SPOLIGOTYPING

A los aislamientos se les extrajo el ADN según lo descrito por van Soolingen y otros.<sup>8</sup> Se empleó el sistema *Spoligotyping* Kit IM9701 (Ocimum Biosolutions Ltd, Hyderabad, India), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y lo descrito por Kamerbeek y otros.<sup>9</sup> Los patrones obtenidos se compararon con la base de datos internacional SITVIT2 "en línea" (<http://www.pasteurguadeloupe.fr:8081/SITVIT>; última actualización: 16 de abril de 2015) y se identificaron los diferentes linajes y sublinajes.

## RESULTADOS

De las 19 muestras que se procesaron el día 24 de julio de 2014, se aislaron 10 *Mtb*: en cuatro de ellos la codificación del cultivo fue baja (de 2 a 6), en dos el cultivo en LJ fue negativo, pero el cultivo líquido (en medio MP, BacT/ALERT 3D, Biomerieux, Francia) fue positivo (no se puede codificar el cultivo por esta vía), y en los cuatro restantes fueron codificaciones altas (de 7 a 9).

Se revisaron y analizaron las muestras enviadas en otro momento de los pacientes involucrados. Del paciente 1 no se recibió otra muestra para diagnóstico. Del paciente 2 se identificó *Mtb* en otras seis muestras, lo que demostró ser un caso de TB "verdadero" y no del episodio de contaminación cruzada. Los pacientes 3, 4, 6 y 7 tuvieron varios cultivos negativos en otras fechas (con 13, 7, 13 y 2 cultivos negativos, respectivamente). Del paciente 5 se identificó *Mtb* en otra muestra (1561) procesada en otro día de trabajo.

En la tabla se muestran los resultados de la caracterización genética por *Spoligotyping* de los cultivos obtenidos del día de procesamiento mencionado. En el aislamiento de la muestra 1435 (paciente 1) se obtuvo un patrón único que no apareció en la base de datos internacional SITVIT2. En los cultivos de las muestras 1438 y 1439 (paciente 2) se identificó el linaje Beijing (tipo 1). En los siete cultivos restantes (de los pacientes 3 al 7), el linaje que se identificó fue el S, tipo 71. Como los aislamientos obtenidos con las muestras del paciente 5 (1447 y 1448), procesadas el 24 de julio, tuvieron codificaciones altas y fueron del linaje S-tipo 71, se genotipificó también el cultivo de la otra muestra del paciente (muestra 1561), trabajada el día 19 de agosto, en el cual se observó el mismo patrón genético (tabla).



En Cuba, solo se ha informado de un evento similar en 2005 por *Díaz* y otros, en el que se confirmaron, por el análisis del *polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción* (RFLP, por sus siglas en inglés) con la sonda IS6110, resultados falsos del cultivo en nueve aislamientos procedentes del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de La Habana.<sup>12</sup> En ese episodio, se planteó una posible contaminación cruzada de las muestras de esputo en el laboratorio de nivel primario, por muy malas prácticas de laboratorio, durante la preparación de los frotis para la baciloscopia.

A nivel mundial, se han reportado múltiples estudios donde se confirmaron episodios de contaminación cruzada. Uno de ellos fue en Argentina, que de 1996-2007 informaron 26 episodios de contaminación cruzada en 12 laboratorios de la red.<sup>4</sup> En otro estudio en California realizado por *Jasmer* y otros, reportaron en tres laboratorios 2 % de contaminación cruzada.<sup>13</sup> *Al-Otaibi* y otros en Pakistán en 2008, informaron que de 22 muestras estudiadas durante un período aproximado de 5 meses, en 14 se confirmó la contaminación cruzada.<sup>14</sup>

Los resultados obtenidos de los aislamientos de *Mtb* de los pacientes 3, 4, 6 y 7, por *Spoligotyping*, sugirieron que la posible fuente de contaminación fue una (o las dos) de las muestras, de codificación alta al cultivo, del paciente 5. En consecuencia, los cultivos contaminados se desarrollaron tardíamente con escasas colonias. Por otro lado, en otros cultivos analizados de muestras de los pacientes involucrados en el episodio de contaminación y realizados en otro día de trabajo, no hubo positividad.

Algunos investigadores han propuesto que ante un cultivo con escaso desarrollo se debe sospechar siempre contaminación cruzada.<sup>15</sup> No siempre es posible identificar el origen de la contaminación debido a que suelen pasar varias semanas desde el origen de este hasta el desarrollo de los cultivos contaminados, y mucho más tiempo hasta la confirmación del error si no se disponen de las herramientas moleculares; en ese lapso pudieran haber cambiado las circunstancias que originaron el mismo o los instrumentos o reactivos reemplazados.

La complejidad técnica del procedimiento para el cultivo de micobacterias favorece que muchas veces se cometan errores y estos pasen inadvertidos. La descontaminación de la muestra, es el más vulnerable en este sentido; este involucra varios pasos y las soluciones utilizadas durante el mismo pueden contaminarse y albergar bacilos viables por largos períodos; la probabilidad es mayor cuando existe sobrecarga de trabajo y se procesan muchas muestras por jornada.<sup>4,5</sup> En los eventos confirmados en este estudio, el error pudo haberse producido en cualquiera de los pasos que conforman el procesamiento bacteriológico de la muestra clínica, desde la manipulación de la muestra fresca hasta las pruebas de identificación.

Otros factores que pueden propiciar la aparición de la contaminación cruzada por *Mtb* en un laboratorio de micobacteriología son la capacidad de estos organismos de permanecer viables por su resistencia a las condiciones. *Mtb* no tiene un reservorio ambiental, pero es un organismo muy resistente, se ha podido recuperar a partir de frotis que han sido calentados para la tinción ácido-alcohol resistentes o en frotis donde se han dejado secar en el sol. Un organismo que puede sobrevivir en el laboratorio puede contaminar las muestras que se colocan posteriormente en ese mismo entorno.<sup>5</sup>

Entre otras señales de sospecha de contaminación cruzada en el laboratorio, se encuentra la aparición de cultivos positivos con escasas colonias a partir de una o varias muestras con baciloscopia negativa, que fueron procesadas el mismo día o durante la misma semana con una muestra con alta carga bacilar, así como el aumento repentino de la frecuencia de cultivos positivos.<sup>3,4,11</sup> Por otro lado, es importante conocer la información de los datos clínicos de los pacientes involucrados porque refuerza la sospecha de contaminación cruzada cuando la sintomatología clínica es inespecífica en el momento de la toma de la muestra, si la evolución posterior no fue compatible con TB o se confirmó otra etiología del proceso respiratorio.

Para disminuir el riesgo de contaminación cruzada en aras de asegurar la calidad del trabajo del laboratorio de micobacteriología, es necesario cumplir una serie de normas como asegurar el correcto flujo de aire dentro de la cabina de seguridad biológica y en el laboratorio; fraccionar los reactivos en alícuotas pequeñas, sobre todo las que se utilizan en el proceso de descontaminación de las muestras; no se deben procesar más de 12 muestras por sesión de trabajo; respetar rigurosamente los protocolos de trabajo; no abrir los envases ni tubos que contienen las muestras antes de haber cerrado el anterior; no centrifugar en tubos de vidrio; dejar reposar los tubos que han sido centrifugados antes de abrirlos; evitar las formación de aerosoles; y una vez terminado todo el proceso descontaminar la superficie de trabajo y dejarla despejada para que la radiación de luz ultravioleta alcance todos los sectores.<sup>4</sup>

A pesar de que solo se investigaron los cultivos positivos a *Mtb* de un solo día de trabajo, lo que constituye una limitante del estudio, este trabajo muestra que la contaminación cruzada puede pasar en cualquier laboratorio de la red; contribuye a su comprensión y difusión, teniendo una idea aproximada de su magnitud; identifica los procedimientos de riesgo más probables; y alerta a los miembros de la red de la eventualidad de este error de laboratorio, de los mecanismos aconsejables para realizar su vigilancia y de las herramientas disponibles para detectarla.

*Spoligotyping* resulta ser una herramienta útil para la identificación de episodios de contaminación cruzada en el laboratorio. En este trabajo, los resultados de la genotipificación permitieron confirmar los cultivos positivos contaminados e inferir una posible fuente de contaminación durante ese día de trabajo en el laboratorio nacional de referencia. También, resalta la importancia de identificar eventos de contaminación cruzada, pues puede implicar en un mal manejo clínico de los pacientes así como el uso innecesario de un tratamiento largo y costoso, además de influir en el análisis e interpretación de los resultados desde el punto de vista epidemiológico.

Se recomienda difundir los resultados de este estudio al personal de los laboratorios de la red diagnóstica de TB a fin de mejorar la calidad del diagnóstico de la TB en Cuba, y hacer un llamado de alerta al personal de microbiología para que sea capaz de identificar señales de alarma ante posibles episodios de contaminación cruzada de TB en el laboratorio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Geneva: World Health Organization; 2015 [cited 23 Aug 2016]. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1)

2. Rageade F, Picot N, Blanc-Michaud A, Chatellier S, Mirande C, Fortin E, et al. Performance of solid and liquid culture media for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical materials: meta-analysis of recent studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33:867-70.
3. Glynn JR, Yates MD, Crampin AC, Ngwira BM, Mwaungulu FD, Black GF, et al. DNA fingerprint changes in tuberculosis: reinfection, evolution, or laboratory error? *J Infect Dis*. 2004; 190:1158-66.
4. Alonso V, Paul R, Barrera L, Ritacco V. Falso diagnóstico de tuberculosis por cultivo. *Medicina*. 2007; 67:287-94.
5. Burman WJ, Reves RR. Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoiding unnecessary treatment. *Clin Infect Dis*. 2000; 31:1390-5.
6. Martín Herranz AM, Martínez Lirola M, Fernández Fernández R, Bouza E, García de Viedma D. Optimized molecular resolution of cross-contamination alerts in clinical mycobacteriology laboratories. *BMC Microbiol*. 2008 [cited 23 Aug 2016]; 8(30). Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/30>
7. Marrero A, Carreras L, Valdivia JA, Montoro E, González E, Torres R, et al. Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Manual de Normas y Procedimientos. La Habana: Ed. Ciencias Médicas; 2010.
8. Van Soolingen D, de Haas P, Kremer K. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria. *Methods Mol Med*. 2001; 54:165-203. doi: 10.1385/1-59259-147-7:165.
9. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(4):907-14.
10. de Boer AS, Blommerde B, de Haas PE, Sebek MM. False-Positive *Mycobacterium tuberculosis* cultures in 44 Laboratories in The Netherlands (1993 to 2000): Incidence, Risk Factors, and Consequences. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(11):4004-9.
11. Martínez M, García de Viedma D, Alonso M, Andrés S, Bouza E, Cabezas T, Cabeza I, et al. Impact of laboratory cross-contamination on molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:2967-9.
12. Diaz R, Crespo FM, Herrera S, Sevy-Court J, Marrero A, van Soolingen D. Laboratory Cross-Contamination of *Mycobacterium tuberculosis* during preparations of Smears. *J Third World Med*. 2005 [cited 2016 Aug 23]; 2(2). Disponible en: <http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/ijtwm/front.xml>
13. Jasmer RM, Roemer M, Hamilton J, Bunter J, Braden CR, Shinnick T, et al. A Prospective, Multicenter Study of Laboratory Cross Contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8(11):1260-3.

14. Al-Otaibi A, El-Hazmi M. Investigation of Cross Contamination in *Mycobacterium tuberculosis* Laboratory using Epidemiological data and Spoligotyping. Pak J Med Sci. 2008;24(6):827-32.

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

Recibido: 7 de enero de 2016.

Aprobado: 5 de septiembre de 2016.

*María Rosarys Martínez Romero* . Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½. La Lisa. La Habana, Cuba. Correo electrónico: [rosarys@ipk.sld.cu](mailto:rosarys@ipk.sld.cu)/ [mrosarys@infomed.sld.cu](mailto:mrosarys@infomed.sld.cu)