

¿Qué puede ofrecer actualmente el laboratorio de micobacterias en la formación profesional del microbiólogo clínico?

Vicente Ausina

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Badalona (Barcelona). Departamento de Genética y Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. España.

En el presente artículo se constata la escasa formación en micobacteriología clínica dentro del vigente programa de la especialidad y las razones que justifican la necesidad de una formación más prolongada, específica y reglada de los residentes en este campo. El laboratorio actual de micobacterias constituye un excelente modelo para estudiar el impacto y realizar un análisis crítico del valor y las limitaciones de las nuevas técnicas diagnósticas. Los laboratorios de microbiología pueden ofrecer hoy en día prestaciones muy diversas para el diagnóstico y control de las infecciones micobacterianas. El laboratorio actual de micobacterias es inconcebible sin una sólida colaboración de su personal con los clínicos y los epidemiólogos. Sólo en este escenario de colaboración donde la tecnología esté abierta y sea receptiva a la resolución de problemas clínicos pueden formarse nuestros especialistas en el futuro. Probablemente no hay ninguna otra área en los laboratorios clínicos actuales donde las competencias técnicas y profesionales de los microbiólogos estén tan bien definidas y delimitadas.

Palabras clave: Microbiología. Micobacterias. Formación.

What can the microbiology laboratory currently offer in the professional training of clinical microbiologists?

In this chapter it is pointed out the scarce information on clinical mycobacteriology included in the current program of the Clinical Microbiology specialty and the needs of a more prolonged and specific formation in this field. The current Mycobacteriology laboratory is an excellent model to evaluate the impact, value and limitations of the new diagnostic techniques. The laboratory of Mycobacterology can currently offer excellent tools for the diagnosis and control of the infections caused by mycobacterias. The current laboratory is inconceivable without a close collaboration among microbiologists, clinicians and epidemiologists. Only in this collaborative scenario where the technology is open and receptive to resolution of clinical

problems we will be able to educate our specialists in the future. Probably there is not any other area in the clinical laboratory where the technical and professional competences of the microbiologists are so well defined and limited.

Key words: Microbiology. Mycobacteria. Education.

La formación en micobacteriología clínica en el Programa de formación actual de especialistas en Microbiología y Parasitología

Dentro de los “contenidos específicos” del vigente programa de la especialidad (13 grandes capítulos teóricos y 12 prácticos) no hay ninguno referido a micobacterias¹.

La única referencia sobre la necesidad de formación del residente en micobacteriología clínica aparece en el esquema de rotaciones del anexo 3. Allí se dice que el residente debe rotar en su segundo año de residencia durante 4 meses por muestras respiratorias y micobacterias (se entiende 2 meses en cada área en los servicios en que éstas se encuentran individualizadas).

Este escaso protagonismo de la micobacteriología clínica en los programas de formación actuales es, por las razones que se comentan a continuación, un error conceptual importante.

Hay muchas razones que justifican la necesidad de una formación más prolongada, específica y reglada de los residentes en micobacteriología clínica.

Contenidos específicos teóricos²⁻⁷

1. A nivel estructural y biológico las micobacterias poseen rasgos diferenciales suficientemente característicos como para considerarlas de forma independiente a otros microorganismos.

2. La epidemiología y patogenia de las infecciones micobacterianas es suficientemente importante y singular como para considerarlas de forma muy individualizada en los programas de formación.

3. Los principios en los que descansa el tratamiento de las enfermedades micobacterianas y los mecanismos de prevención y control de éstas requieren conocimientos teóricos específicos.

Correspondencia: Dr. V. Ausina.
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Germans Trias i Pujol.
Ctra. de Canyet, s/n. 08916 Badalona. Barcelona. España.
Correo electrónico: vausina@ns.hugtip.scs.es

Contenidos específicos prácticos⁷⁻¹¹

1. El laboratorio de micobacterias utiliza técnicas y procedimientos suficientemente singulares como para que sean aprendidos individualizadamente.

2. Esta singularidad alcanza también a las técnicas de estudio de sensibilidad *in vitro*, que son esencialmente diferentes a las utilizadas para otras bacterias.

3. Finalmente, el laboratorio de micobacterias constituye un excelente modelo para estudiar el impacto y realizar un análisis crítico del valor y las limitaciones de las nuevas técnicas diagnósticas (técnicas de amplificación genética, sondas genéticas y otras técnicas alternativas de identificación microbiana, análisis molecular de resistencias, técnicas de epidemiología molecular, etc.).

Posiblemente no hay otro lugar en los laboratorios clínicos actuales, excepto tal vez las secciones de virología clínica, donde pueda seguirse de forma más adecuada ni con mayor rigor la evolución de las nuevas tecnologías.

Contenidos culturales

En cuanto a contenidos de tipo cultural profesional que trascienden el ámbito de las micobacterias. Esta sección del laboratorio es un lugar idóneo para que los residentes se planteen y reflexionen sobre:

1. El control de calidad y su trascendencia.
2. Normativas de seguridad biológica.
3. Relaciones con los servicios clínicos y con las autoridades sanitarias en temas relativos a Salud Pública.

Probablemente no hay ninguna otra área en los laboratorios clínicos actuales donde las competencias técnicas y profesionales de los microbiólogos estén tan bien definidas y delimitadas.

Evolución de las técnicas diagnósticas en micobacteriología clínica a lo largo del pasado siglo y orígenes del presente

La evolución de las técnicas diagnósticas ha seguido, por razones diversas, diferentes etapas bien diferenciadas en las que los progresos han sido heterogéneos.

Una primera etapa, muy prolongada, se extendió hasta la mitad de la década de 1970 y se caracterizó porque no se produjeron progresos tecnológicos realmente relevantes en las técnicas de diagnóstico¹².

Durante todo este dilatado período de tiempo los laboratorios utilizaron una tecnología convencional con evidentes limitaciones de cara a las necesidades de la práctica clínica (baja sensibilidad de las técnicas de examen microscópico directo y excesiva lentitud de las técnicas de cultivo, identificación y antibiograma).

Estas técnicas tradicionales son, con algunas modificaciones relevantes en los procedimientos de cultivo e identificación, plenamente vigentes en la actualidad.

Los procedimientos de digestión-descontaminación de las muestras que contienen flora comensal utilizados en la actualidad han variado muy poco a lo largo de los años. El hecho de que las micobacterias, por sus constituyentes de pared celular, sean más resistentes que otros micro-

organismos a los ácidos y bases fuertes, permite utilizar estas sustancias para eliminar bacterias y otros microorganismos comensales presentes en las muestras clínicas y evitar que interfieran en el crecimiento de las micobacterias^{13,14}.

La soltura en el manejo y evaluación de estas técnicas es importante en la formación del residente, que debe conocer que la utilización inapropiada de éstas puede afectar la viabilidad de las micobacterias y producir falsos cultivos negativos (por exceso de descontaminación) o a un número elevado de contaminaciones (por defecto de descontaminación)¹². Un porcentaje aceptable de contaminaciones en los medios sólidos se estima en el 3-5%, dependiendo del tipo de muestras clínicas. Un índice de contaminación inferior al 3% es preocupante por exceso y cuando éste es superior al 5% sugiere un proceso de descontaminación demasiado suave o de digestión incompleta.

Otra etapa bien diferenciada abarcó la segunda mitad de la década de 1970 y se caracterizó por la introducción de una tecnología de cultivo aún no superada: los sistemas radiométricos de detección del crecimiento (Bactec 460 TB®, Becton Dickinson Lab. Systems)^{11,12}. Con esta nueva tecnología se consiguió¹⁵:

1. Un ahorro considerable de tiempo (de aproximadamente 15-20 días) en la detección del crecimiento de las micobacterias.
2. La posibilidad de realizar antibiogramas de *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos de primera elección en 5-10 días aproximadamente.

La limitación más importante de este nuevo sistema era la necesidad de trabajar con isótopos radiactivos (C¹⁴); esto suponía una limitación importante para muchos laboratorios pequeños que no podían disponer de las licencias necesarias para almacenar y trabajar con estos compuestos.

La tercera etapa se desarrolló a lo largo de la década de 1980 y se caracterizó por dos hechos importantes que condicionaron mucho la evolución de las técnicas diagnósticas: la aparición epidémica del SIDA y el acelerado desarrollo de nuevas tecnologías¹¹.

La evolución de las técnicas diagnósticas en esta época se caracterizó:

1. Por el desarrollo de técnicas rápidas de cultivo no radiométricas⁸.
2. La estandarización de técnicas eficaces de hemocultivo para micobacterias¹⁶.
3. El desarrollo de técnicas rápidas de identificación alternativas (técnicas cromatográficas y sondas genéticas)¹⁷⁻²⁰.

En la tabla 1 figuran los principales medios de cultivo líquidos o bifásicos no radiométricos comercializados de lectura automática o visual y sus principales características⁷.

Aunque ninguno de estos sistemas supera en rapidez y sensibilidad al BACTEC 460 TB®, la utilización combinada de un medio sólido y de uno de estos medios líquidos se considera actualmente lo más idóneo, buscando una sensibilidad óptima y rapidez en la detección del crecimiento.

Los estudios de sensibilidad *in vitro* que utilizan estos nuevos medios líquidos no radiométricos no han sido aún aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) con

TABLA 1. Principales sistemas de cultivos líquidos o bifásicos disponibles para el cultivo de micobacterias

Sistema de cultivo	Características	Tipo de lectura	Detección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (media [límites] en días)	Detección de otros <i>Mycobacterium</i> (media [límites] en días)	Casa comercial
Septi-Check AFB	Bifásico	Visual	14 (9-50)	18 (7-37)	Becton Dickinson
<i>Mycobacterial</i>	Líquido	Automatizada	12 (5-35)	12 (10-60)	Becton Dickinson
<i>Growth Indicator Tube</i> (MGIT)	Líquido	Automatizada	12 (5-35)	12 (10-60)	Becton Dickinson
Bactec 9000 MB	Líquido	Automatizada	12 (5-35)	12 (10-60)	Becton Dickinson
ESP II	Líquido	Automatizada	15 (8-36)	16 (9-58)	Difco
MB-BacT	Líquido	Automatizada	14 (8-36)	15 (10-48)	Organon Teknika

TABLA 2. Características técnicas de diferentes sistemas de amplificación genética comercializados para el diagnóstico de la tuberculosis

Nombre comercial	Sistema de amplificación	Ácido nucleico diana	Extracción de ácidos nucleicos	Enzimas de amplificación	Amplificación isotérmica	Automatización	Sistema de detección
Cobas AmpliCor (Roche)	PCR	ADN (ARNr 16s)	Lisis alcalina	Taq polimerasa	No	Sí (amplificación y detección)	EIA ^a
LCx MTB (Abbott)	LCR	ADN (PaB)	Temperatura, lisis mecánica	ADN polimerasa ADN ligasa	No	Sí (detección)	MEIA ^b
AMTDT-2 (Gen Probe)	TMA	ARNr 23s	Lisis mecánica	ARN polimerasa Transcriptasa inversa	Sí	No	HPA/EQL ^c

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; LCR: reacción en cadena de la ligasa; TMA: amplificación mediada por transcripción.
^aenzimoinmunoanálisis; ^benzimoinmunoanálisis de micropartículas; ^cprueba de protección de la hibridación/electroquimioluminiscencia.

este fin, aunque cada vez se publican más artículos en los que son evaluados en comparación con las técnicas de referencia.

Las técnicas de identificación alternativas se introdujeron para incrementar la rapidez y solucionar los problemas de imprecisión de las técnicas de identificación convencional. Algunas de estas técnicas continúan teniendo plena vigencia en la actualidad^{8,9}:

1. Las sondas genéticas para identificar micobacterias aisladas en medios sólidos o líquidos. Actualmente están disponibles sondas genéticas frías para la identificación de *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. goodii* (Accu Probe[®], Gen Probe)¹⁷.

2. Las técnicas de identificación cromatográfica (cromatografía de capa fina, gas-líquido y HPLC) permiten poner en evidencia los perfiles lipídicos específicos de la pared micobacteriana e identificar de forma y rápida y reproducible las micobacterias¹⁸⁻²⁰.

Llegamos así a una cuarta etapa, la actual, caracterizada por el desarrollo y aplicación de las nuevas técnicas de amplificación genética a los siguientes ámbitos⁸⁻¹⁰:

1. Diagnóstico rápido de la tuberculosis¹⁰.
2. Desarrollo de nuevas técnicas de identificación^{21,22}.
3. Detección de las mutaciones responsables de los genotipos de resistencia³⁷.
4. Estudios de epidemiología molecular^{24,25}.

Durante la última década se han desarrollado una serie de técnicas de biología molecular que permiten la amplificación de secuencias de ADN y ARN específicas de *M. tuberculosis*.

Las técnicas de amplificación genética permiten generar a partir de una única copia de ADN o ARN, y mediante un proceso enzimático, millones de copias de ácido nucleico diana, facilitando de esta forma la detección directa de *M. tuberculosis* en las muestras clínicas.

Esta tecnología ha logrado solventar, al menos en parte, los principales problemas inherentes a las técnicas microbiológicas convencionales, permitiendo establecer diagnósticos rápidos (entre 2 y 8 h) y mejorar la sensibilidad de las técnicas clásicas⁸⁻¹⁰.

El interés de diferentes compañías multinacionales en el desarrollo de estas técnicas de amplificación ha conducido a la aparición de reactivos y equipos más o menos sofisticados que estandarizan, simplifican y en algunos casos automatizan las reacciones de amplificación. Esto ha sido determinante para que esta tecnología haya podido ser aplicada, con las debidas garantías, en el diagnóstico de la tuberculosis.

En la actualidad se dispone en el mercado de una gran variedad de sistemas de amplificación, que proveen los reactivos necesarios y que permiten trabajar en condiciones estandarizadas, ofreciendo amplias posibilidades en el diagnóstico actual de la tuberculosis (tabla 2)¹¹.

Los retos planteados de cara al futuro en este campo son los siguientes¹¹:

1. Incrementar la sensibilidad de las técnicas de amplificación en muestras Ziehl-Neelsen negativas.
2. Idear procedimientos para neutralizar las sustancias inhibitoras de las reacciones de amplificación, especialmente en muestras extrarrespiratorias.
3. Automatizar tanto el proceso de preparación de la muestra como las de amplificación y detección del producto

amplificado, con el fin de facilitar el trabajo y minimizar el riesgo de contaminación por amplicones durante el procesamiento manual de las muestras. Actualmente sólo el sistema Cobas Amplicor nos ofrece un equipo que permite trabajar de forma totalmente automatizada.

Las técnicas de identificación basadas en amplificación genética también han abierto nuevos caminos en los últimos años.

Polimorfismo de los fragmentos de restricción (PRA)²¹

Es una de las más utilizadas. Se basa en la amplificación de un fragmento de ADN común a todas las especies de micobacterias (que codifica la proteína 65 K), seguida de una digestión posterior con 2 enzimas de restricción (Hae III y Bst E II) y visualización posterior de los fragmentos obtenidos en un gel de agarosa tras tinción con bromuro de etidio. Los patrones de restricción obtenidos son específicos de las distintas especies de micobacterias.

Entre las principales ventajas de esta técnica están las siguientes: necesidad de poco inóculo, rapidez y capacidad de identificar la mayoría de especies descritas. Entre sus inconvenientes cabe destacar la necesidad de disponer de los materiales necesarios para la amplificación y electroforesis de geles de agarosa, así como el adiestramiento en la lectura e interpretación de resultados.

Secuenciación de ácidos nucleicos²²

Se basa en la amplificación y posterior secuenciación de un fragmento del gen *RNAr 16s*, de secuencia conocida en las distintas especies de micobacterias.

Este gen está bastante conservado, pero tiene zonas variables con secuencias de nucleótidos específicas de género y especie, que son las que se amplifican. Con esta metodología se han podido identificar y describir recientemente nuevas especies del género *Mycobacterium*.

Las técnicas genéticas actuales también permiten dar a conocer las mutaciones cromosómicas que causan la resistencia de las micobacterias a los quimioterápicos y abren una nueva vía para conocer las resistencias a los fármacos antituberculosos¹⁵.

La genética molecular es también la herramienta actual más útil como marcador epidemiológico. La mayoría de aplicaciones epidemiológicas del análisis con enzimas de restricción (RFLP) han utilizado la secuencia de inserción IS 6110, que está presente en 1 a 20 copias en el genoma de *M. tuberculosis*. Algunas cepas con escaso número de copias de IS 6110 deben ser tipificadas con otro sistema de estudio como el *spoligotyping* (*spacer oligonucleotide typing*); este método detecta la presencia o ausencia de secuencias de unión variables dentro de la región DR (*direct repeat region*)^{24,25}.

Algunas aplicaciones en las que puede ser de utilidad el estudio de la huella genética con IS 6110 son las siguientes:

1. Estudio epidemiológico de la tuberculosis comunitaria.
2. Detección de transmisión no sospechada de *M. tuberculosis*.
3. Investigación de transmisión de tuberculosis nosocomial.
4. Estudios de patogénesis (diferenciación entre reinfección y reactivación).

TABLA 3. Prestaciones actuales de los laboratorios de microbiología para el diagnóstico y control de las infecciones micobacterianas

A. Examen microscópico tras tinción
De manera urgente por Ziehl-Neelsen: antes de 1 h
De manera rutinaria por auramina O: antes de 24 h
B. Amplificación genética de ADN o ARN
A todos los pacientes con baciloscopia positiva: antes de 24 h
En pacientes con baciloscopia negativa: según contexto clínico
C. Cultivo de micobacterias
Uso combinado de un medio sólido y un medio líquido
Resultados positivos de cultivo: antes de 14 días
D. Identificación de micobacterias
Uso combinado de pruebas bioquímicas, sondas y cromatografía
Resultados de identificación: antes de 14 días del aislamiento
E. Antibiogramas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
No debe hacerse de manera sistemática
Se realizarán según contexto clínico o epidemiológico
Resultado: antes del mes de recibir la muestra
F. Estudios de epidemiología molecular

5. Identificación de contaminaciones cruzadas en el laboratorio.

El laboratorio actual de micobacterias. Análisis coste-beneficio. Criterios de selección de las técnicas^{8-10,26}

Los laboratorios de microbiología pueden ofrecer hoy día prestaciones muy diversas para el diagnóstico y el control de las infecciones micobacterianas (tabla 3).

El laboratorio actual de micobacterias es inconcebible sin una sólida colaboración de su personal con los clínicos y los epidemiólogos.

Algunas de las sofisticadas técnicas actuales (amplificación genética, estudios de susceptibilidad *in vitro*, técnicas de epidemiología molecular, etc.) son de coste realmente elevado y no está justificado su uso indiscriminado.

Se han de fijar de forma conjunta las indicaciones y las técnicas que es necesario utilizar en casos concretos o especiales. El establecimiento de reuniones frecuentes entre el personal implicado en la toma de decisiones es, por tanto, fundamental para la discusión de los casos clínicos y para crear la cultura necesaria que facilite la utilización más adecuada de los recursos técnicos disponibles en beneficio del enfermo y la comunidad.

Sólo en este escenario de colaboración donde la tecnología está abierta y es receptiva a la resolución de problemas clínicos pueden formarse nuestros especialistas en el futuro.

El microbiólogo clínico ha de ser un profesional que combine un conocimiento profundo de la microbiología con la capacidad de comprender los problemas clínicos.

Ha de estar habituado a plantear los aspectos sintomáticos y sindrómicos de las enfermedades infecciosas. Ha de pasar del laboratorio a la práctica clínica y a la inversa, según lo considere necesario, sin sentir que pasa a través de una barrera que delimita su actividad profesional.

Para conseguir este tipo de profesional, el laboratorio actual de micobacterias puede ser una buena escuela.

Bibliografía

1. Microbiología y Parasitología. Programa elaborado por la Comisión Nacional de la Especialidad y aprobado por la Secretaría de Estado de Universidades e Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia por Resolución de fecha 25 de abril de 1996.
2. Steyn AJC, Chan J, Mehra V. Recent development in mycobacterial research. *Curr Opin Infect Dis* 1999;12:415-24.
3. Pelicic V, Reytrat JM, Gicquel B. Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol* 1998;28:413-20.
4. Banta D. International group of health experts issues global "declaration to stop TB". *JAMA* 2000;283:2375-7.
5. Blower SM, Small PM, Hopewell PC. Control strategies for tuberculosis epidemics: New models for old problems. *Science* 1996;273:497-500.
6. American Thoracic Society. Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. *Clin Infect Dis* 1995;21:9-27.
7. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Resp Crit Care Med* 2000;161:1376-95.
8. Salfinger M, Pfyffer GE. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:961-79.
9. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR, Good RC. The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* 1993;31:767-70.
10. American Thoracic Society. Rapid diagnostic test for tuberculosis. What is the appropriate use? *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1804-14.
11. Ausina V, Manterola JM, Padilla E. Nuevas perspectivas en el diagnóstico bacteriológico. En: Sauret J, editor. *Tuberculosis: una visión actual*. Madrid: Aula Médica, 2001; p. 31-66.
12. Wolinsky E. Conventional diagnostic methods for tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1994;19:396-401.
13. Hall GS. Primary processing of specimens and isolation and cultivation of mycobacteria. En: Heifets LB, editor. *Clinics in Laboratory Medicine. Clinical mycobacteriology*. Philadelphia: WB Saunders, 1996;16:551-67.
14. Kent PJ, Kubica GP. *Public health mycobacterology. A guide for the level III laboratory*. US. Department of Health and Human Services. Atlanta: Centers for Disease Control, 1985.
15. Middleton AM, Chadwick MV, Gaya H. Evaluation of a commercial radiometric system for primary isolation of mycobacteria over a fifteen-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:166-70.
16. Salfinger M, Stool EW, Pilot D, Heifets L. Comparison of three methods for recovery of *Mycobacterium avium* complex from blood specimens. *J Clin Microbiol* 1988;26:1225-6.
17. Reisner BS, Gatson AM, Wodds GL. Use of Gen Probe Accu Probes to identify *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii* directly from BACTEC TB broth culture. *J Clin Microbiol* 1994;32:2995-8.
18. Minnikin DE, Hutchinson IA, Caldicott AB, Goodfellow M. Thin-layer chromatography of methanolsates of mycolic acid containing bacteria. *J Chromatogr* 1980;221-3.
19. Luquín M, Ausina V, López-Calahorra F, Belda F, García-Barceló M, Celma C, et al. Evaluation of practical chromatographic procedures for identification of clinical isolates of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1991;29:120-30.
20. Butler WR, Jost KC Jr, Kilburn JD. Identification of mycobacteria by high performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 1991;29:2468-72.
21. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993;31:175-8.
22. Kirscher P, Springer B, Vogel U, Meier A, Wrede A, Kickembeck M, et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: Reput of 2-year experience in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1993;31:2882-9.
23. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: Molecular genetics insights. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:496-514.
24. Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Einanich KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:406-9.
25. Haas Wh, Butler Wr, Woodley CL, Crawford JT. Mixed-linker polymerase chain reaction: A new method for rapid fingerprinting of isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1993;31:1293-8.
26. Robinson A. Rationale for cost-effective laboratory medicine. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:185-99.