

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Evaluación de una técnica para el diagnóstico presuntivo de *Mycobacterium tuberculosis*

TESIS para optar al Título Profesional de : BIÓLOGO CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

AUTOR

Elma Alcira Pandia Fajardo

LIMA – PERÚ 2006

MIEMBROS DEL JURADO

Dra. Libertad Alzamora Gonzáles (Presidenta)

Mg. Débora Alvarado Iparraguirre (Miembro)

Mg. Susana Gutiérrez Moreno (Miembro)

M.Sc. Ruth García De la Guarda (Asesora interna de tesis)

ASESORA INTERNA

M.Sc. RUTH GARCÍA DE LA GUARDA

Dpto. Académico de Microbiología y Parasitología

Facultad de Ciencias Biológicas

UNMSM

ASESORA EXTERNA

Dra. NELLY BORJA SANTA CRUZ

Dpto. de Microbiología Médica

Facultad de Medicina Humana

UNMSM

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a nuestro Padre Jehová y a nuestro amado Señor Jesucristo, por ser mi salvador, ayudador y fortaleza en mi largo caminar.

Agradezco a mis padres: Don Tomás y Doña Alcira, por su gran amor y comprensión por ser mi apoyo y sustento en todo momento.

Agradezco a mis hermanos; Elsa, Germán, Romel y a mis sobrinos: Deisy y Jorge por contar siempre con su amistad.

Agradezco a mis hermanos en Cristo, miembros de la Iglesia Bíblica Evangélica de Tungasuca (IBET), a los pastores por sus consejos y constantes oraciones.

Agradezco a mis asesoras: M.Sc. Ruth García de la Guarda, al Hospital Nacional Guillermo Almenara I. Servicio de Microbiología. Laboratorio Central de Tuberculosis en la persona de la Dra. Nelly Borja Santa Cruz por permitirme desarrollar esta investigación.

Agradezco a las profesoras miembros del jurado: Dra. Libertad Alzamora G, Mg. Débora Alvarado Iparraguirre y Mg. Susana Gutiérrez Moreno.

DEDICATORIA

DEDICO ESTE TRABAJO A DIOS NUESTRO
SEÑOR, QUIEN HA SIDO MI FORTALEZA Y GUÍA
EN TODO MOMENTO.

“TODO LO PUEDO EN CRISTO QUE ME FORTALECE”.

FILIPENSES 4:13

RESUMEN

La tuberculosis en cualquiera de sus manifestaciones, en la actualidad, es sin duda uno de los problemas de salud pública más importantes y la búsqueda de un método de diagnóstico rápido ha sido y es, uno de los principales objetivos en muchas partes del mundo, sobre todo en países como el nuestro que presenta altas tasas de incidencia y cuya población más afectada no cuenta con los medios económicos para acceder a cualquiera de los métodos de diagnóstico rápido existentes.

La finalidad del presente estudio fue evaluar el medio de cultivo Löwenstein - Jensen modificado con nitrato de potasio (KNO_3) para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*, comparando la sensibilidad y especificidad de este medio modificado con el medio Löwenstein - Jensen convencional y evaluando los factores importantes que influyen en el proceso como por ejemplo el tiempo.

En el presente estudio, se evaluó un total de 120 muestras provenientes de pacientes diagnosticados con tuberculosis pulmonar por baciloscopia, las muestras (esputo, lavado bronquial, aspirado bronquial, aspirado gástrico) se trataron por el método Petroff modificado para su descontaminación y homogenización y se sembraron en los medios Löwenstein - Jensen convencional y modificado con nitrato de potasio al 35%. Luego estos cultivos fueron incubados a 37°C durante 7, 10, 14 días, después de los cuales se determinó la reducción de nitratos a nitritos. El nitrito producido por *Mycobacterium tuberculosis* permitió identificar la presencia de la bacteria empleando el reactivo de Peter Griess, detectado por medio de un viraje de color del medio de cultivo.

En el medio Löwenstein - Jensen modificado, se determinó que la sensibilidad era del 41% y la especificidad del 100%, con un valor predictivo positivo de 100%, y valor predictivo negativo de 34%.

Al comparar estadísticamente la sensibilidad y especificidad de la prueba en el medio modificado y el cultivo convencional o Estándar de oro, se observó que los factores predominantes en el proceso de evaluación son: tipo (esputo, lavado bronquial, aspirado bronquial, aspirado gástrico) y calidad de la muestra (Carga Bacilar), obtenidas adecuadamente.

Los resultados fueron obtenidos en su mayoría a los 10 días, con un promedio ponderado de 12 días para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*.

El estudio realizado justifica el empleo del medio Löwenstein - Jensen modificado conteniendo nitrato de potasio (KNO_3), presentándose como una alternativa para el diagnóstico presuntivo de *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

The tuberculosis in any of its manifestations, one becomes of without a doubt the public-health problems more important at the present time and it has been a diagnostic quest and it is, one of the objective main things in many parts of the world, most of all in countries as the our that he presents high incidence rates and whose more population once was affected does not count on the economic means to accede to any of the diagnostic-methods existents.

The present study's purpose was to evaluate Löwensein-Jensen's midway modified with nitrate reductase in order to the pulmonary tuberculosis's diagnosis, *Mycobacterium tuberculosis's* identification, comparing sensibility and modified specificity of this midway with the cultivation conventional Löwenstein-Jensen and evaluating the main factors that have influence in the process for example the Time.

In the present study evaluated 120 samples coming from patients diagnosed with pulmonary tuberculosis for bacilloscopy; the samples them tried to him for the method Petroff once was modified in order to his decontamination and homogenization before being sown in the Löwensein-Jensen's midway conventional and modified, with potassium nitrate to 37 per cent.. The cultures were incubated went to 37 °C for 7, 10, 14 days; then the nitrate reduction was suggesting growth to nitrite. To positive reaction was detected by means of a color turn.

In the Löwensein-Jensen's midway conventional obtained a sensibility of 41 per cent and specificity of 100 per cent in the Löwenstein-Jensen midway modified, with a positive value once of 100 per cent and negative value once of 34 per cent.

To the comparing statistically sensibility and specificity of the essay test with nitrate reductase and the conventional cultivation or Gold Standard headed that the

prevailing factors in the evaluation process are: the type and quality of the sample quality (charges Bacilar), fitting to obtain.

The results were obtained afterwards in the main to the 10 days, with a 12 days average prudent in order to TB'S diagnosis - Pulmonar

The study once was accomplished justifies test's job Löwenstein - Jensen modified with potassium of Nitrate (KNO₃), encountering as an alternative in order to the *Mycobacterium tuberculosis*'s diagnosis.

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es uno de los principales problemas de salud pública en la actualidad y por esta razón se continúa buscando métodos de diagnóstico que permitan reportar resultados confiables del agente etiológico en menor tiempo en comparación con los métodos convencionales de cultivo. La bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico de esta enfermedad, tiene dos principales características de crecimiento. No crece en medios de cultivo comunes, sino que requiere de medios de cultivo enriquecidos con albúmina del suero bovino o con yema de huevo; y presenta un crecimiento muy lento. Se estima que en condiciones de cultivo requiere entre 15 y 20 horas de tiempo de generación, tanto en medios líquidos como sólidos (Montoto *et al.*, 2004), por lo que las colonias aparecen en uno o dos meses.

Para que un examen bacilosκόpico de esputo sea positivo debe haber un número mínimo de bacterias por mililitro de muestra, el que está estimado en 5000 bacilos, en tanto que para que el cultivo sea positivo esta fracción debe ser de 10 a 100 bacilos por mililitro en la muestra de esputo expectorada (Díaz *et al.*, 2005).

La piedra angular del diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis es la microscopía directa por la coloración de Ziehl-Neelsen. Este método es rápido, barato y específico, sin embargo, su sensibilidad es menor del 75% en las muestras pulmonares y del 50% en las extrapulmonares (Montoto *et al.*, 2004).

En estas dos últimas décadas se ha considerado como “estándar de oro”, prueba de referencia para la detección de micobacterias, al empleo del cultivo en medio sólido (Löwenstein-Jensen u Ogawa) y al cultivo en medio líquido (Middlebrook 7H12) (Prat *et al.*, 2000).

El cultivo en Löwenstein-Jensen modificado es una técnica rápida para detectar la presencia cualitativa de la micobacteria tuberculosa en un promedio de 12 días, produciéndose un viraje instantáneo de color, clasificando los resultados desde negativo (no cambia de color), 1+ (rosa pálido) hasta 5+ (de rojo hasta violeta) (Angeby *et al.*, 2002), a diferencia del método convencional que registra la presencia de la micobacteria tuberculosa de 45 a 60 días por la detección visual de las colonias (Diaz *et al.*, 2005), por lo tanto, los resultados pueden ser obtenidos más rápidamente por la técnica modificada que por la convencional.

La presente investigación se ha planteado con la finalidad de mejorar los métodos convencionales actualmente usados para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* en nuestro país. El método desarrollado es relativamente nuevo, y este trabajo se está evaluando por primera vez para su empleo en el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. Los resultados obtenidos contribuirán en la evaluación de esta metodología.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar el cultivo de las muestras de pacientes sospechosos de padecer tuberculosis, en el medio Löwenstein-Jensen modificado con la adición de KNO₃ para incorporar la prueba de la nitrato reductasa, que pueda ser utilizada para el diagnóstico presuntivo de *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivo Específico

Comparar el tiempo de diagnóstico entre el cultivo en Löwenstein-Jensen modificado con el cultivo en Löwenstein-Jensen convencional, considerando las diferencias de sensibilidad y especificidad.

II. ANTECEDENTES

2.1. Historia biológica de la tuberculosis

Roberto Koch (1843-1910) en 1882 descubre el agente etiológico (*Mycobacterium tuberculosis*), luego desarrolla la tuberculina (1891), nombre que le diera por consejo de su discípulo, Von Budjwid, y que permitió a Clemens von Pirquet (1874-1929) en 1907 iniciar los estudios tuberculínicos con las modificaciones posteriores de Charles Mantoux (1879-1929, método intradérmico). Esta etapa

tiene como antecedentes el conocimiento cierto de la contagiosidad de la tuberculosis obtenido por Villemin en 1865, y el descubrimiento de los Rayos X por Röntgen (1845-1923) en 1895, con su aplicación al diagnóstico (Guevara *et al.*, 2003).

El descubrimiento del bacilo de la tuberculosis fue anunciado por Koch a la Sociedad de Fisiología de Berlín el 24 de marzo de 1882, razón por la cual se conmemora en esa fecha, 24 de marzo de cada año, el Día Mundial de la Tuberculosis. Ese día Koch concluía su presentación expresando: «De aquí en adelante no tendremos más frente a nosotros a una cosa vaga e indeterminada, estamos en presencia de un parásito visible y tangible. Se desarrolla en el hombre y conseguir las fuentes de donde viene la infección, y una de ellas es seguramente la expectoración, la lucha antituberculosa será un hecho». Pensaba que la tuberculosis pulmonar y la escrófula eran dos enfermedades diferentes, y así lo sostuvo hasta el fin de sus días. Koch no reparó que las cepas humanas y bovinas eran dos cepas diferentes, hecho que hacia fines del siglo XIX reconoció Theobald Smith en EE.UU. (Davies). Koch mostró también las células gigantes, el granuloma tuberculoso y los bacilos intracelulares.

En 1882, Forlanini (1847-1918) desarrolló un método de curación basado en el colapso del pulmón enfermo, el neumotórax artificial, que se inició como terapéutica en 1888, y fue introducido en nuestro país.

Los estudios clínico-patológicos continuaron a través del siglo XIX y XX. Siendo hacia el final notables los estudios comparando con los resultados radiológicos que se iban obteniendo. El trabajo de Parrot, Kuss y Ghon dilucidaron los cambios característicos de la infección primaria, y apoyaron la teoría de que la mayoría de las infecciones tuberculosas lo eran por vía inhalatoria. La patogenia de la tuberculosis generalizada fue demostrada por Carl Weigert en 1882, así como el mecanismo de producción de las tuberculosis laríngea e intestinal, tan

comunes en la época preantibiótica. Demostró, además, la presencia de diseminaciones por vía bronquial. Ranke, en 1917, trató de clarificar la evolución de la tuberculosis proponiendo tres estados evolutivos. El primario, correspondiente a la primoinfección tuberculosa; el secundario, a las diseminaciones hematógenas; y el terciario, a la tuberculosis de los adultos. Provocó una verdadera polémica en cuanto a la naturaleza «endógena» o «exógena» de las infecciones.

En 1887, (Edimburgo), Sir Robert Phillips funda la primera organización de lucha antituberculosa, denominándolo “Dispensario Antituberculoso”. Después, desarrolla un hospital para «casos iniciales» y luego otro para casos «avanzados» y finalmente una colonia agrícola para convalecientes.

La adecuación de establecimientos por clasificación de grados evolutivos de enfermedad se basa precisamente, en este esquema conocido por los tisiólogos como “Esquema de Edimburgo”.

La conferencia internacional de la tuberculosis reunida en 1902, donde se elige la doble cruz de Lorena como su emblema. La unión Internacional contra la tuberculosis y más tarde de enfermedades respiratorias se fundó en 1920, y la Unión Latinoamericana de Sociedades de Tisiología y más tarde de enfermedades respiratorias, se inició en 1933.

2.2. Micobacterias

Son bacilos aerobios que no forman esporas, conidias o cápsulas, el crecimiento es similar a un micelio o se hace filamentoso. Aunque no toman la coloración de Gram, sus paredes celulares tienen la estructura de bacterias Gram positivas. Además de muchas especies saprofitas, el grupo comprende microorganismos

patógenos (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*) que causan enfermedades crónicas con lesiones del tipo de granuloma infeccioso en el hombre (Prat *et al.*, 2000).

Hay más de 100 especies de micobacterias reconocidas, las cuales no son móviles, son ligeramente rectas o ligeramente curvadas, miden entre 0,2 y 0,6 μ de ancho y 1,0 a 10 μ de largo, ocasionalmente presentan alguna ramificación (Montoto *et al.*, 2004).

Para reconocerlos hay que efectuar la coloración de Ziehl-Neelsen, como son ácido-alcohol resistente la decoloración con alcohol y diversos ácidos fuertes no los afecta. Menos frecuentemente se utiliza el método de Kinyoun (Guevara *et al.*, 2003).

2.3. Especies de micobacterias

Según la velocidad de crecimiento, la morfología y capacidad de pigmentación de las colonias en medios sólidos, las micobacterias se dividieron, hace varios años, en diversos grupos. Así, se establecieron dos grupos clásicos: micobacterias de crecimiento lento y rápido según requieran un tiempo superior o inferior 7 días, respectivamente, para producir colonias visibles. Y por otro lado, se combinaba la posibilidad de no producir pigmento (no cromógenas) o hacerlo en ausencia (escotocromógenas) o presencia de la luz (fotocromógenas). De esta forma surgieron 4 grupos con cierta transcendencia clínica (Runyon, 1959): Grupo I (fotocromógenas), Grupo II (escotocromógenas), Grupo III (no cromógenas) de crecimiento lento y el Grupo IV (no cromógenas), de crecimiento rápido (Tabla 12). Aunque esta clasificación tiene cierta utilidad microbiológica, en la actualidad, ante la incesante aparición de nuevas especies y las diferentes características fenotípicas

que algunas de ellas pueden adoptar, se prefiere realizar la clasificación a nivel de especie (Tabla 13 y 14).

Con fines prácticos, se establecieron tres grupos en función de la entidad(es) nosológica(s) producida(s), es decir la enfermedad que producen:

A. El complejo *Mycobacterium tuberculosis* que produce la tuberculosis, se encuentra formado por las especies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* (incluido el bacilo de Calmette-Guerin o BCG utilizado en la vacunación), *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microti*, que producen tuberculosis en las ratas.

B. La lepra que está causada por *Mycobacterium leprae*.

C. Las micobacteriosis, que están producidas por el resto de micobacterias distintas de las anteriores. Este es un grupo complejo que ha recibido múltiples denominaciones: micobacterias atípicas, ambientales, oportunistas o no tuberculosas (MNT) entre otras.

Aunque ninguna de ellas es totalmente aceptada, se ha adoptado la de micobacterias no tuberculosas (MNT). Estas se caracterizan por un menor poder patógeno que varía de especie a especie, pudiendo ser oportunistas o simplemente saprofitas. Por otro lado el reservorio parece ser, en muchos casos, ambiental sin haberse documentado la transmisión interhumana. Por último, las MNT presentan una mayor resistencia a los antimicobacterianos convencionales (Montoto, 2001; Guevara *et al.*, 2003).

2.4. *Mycobacterium tuberculosis*

Pertenece al phylum Actinobacteria, clase Actinobacteria, orden de los Actinomycetales, familia de las Mycobacteriaceae, género *Mycobacterium*, especie

Mycobacterium tuberculosis. Es un bacilo aerobio muy difundido en el hombre y animales, a los que enferma y en cuyas secreciones se le puede hallar.

Mycobacterium tuberculosis mide entre 2 y 5 μ de largo y 0,2 a 0,3 μ de ancho, adoptando forma de bastoncito, con extremos redondeadas, inmóvil, sin cápsula, esporas, ramificaciones. A veces están aislados y otras entrelazados, dividiéndose transversalmente. Se los encuentra en los extendidos de la expectoración de los enfermos, solos o agrupados (Mejía *et al.*, 2004; Gonzáles *et al.*, 2003).

La capacidad para reducir nitratos es típico de *Mycobacterium tuberculosis* (Tabla 14), aunque algunas especies de micobacterias como por ejemplo, *M. kansasii* también reducen el nitrato (Kent *et al.*, 1985; Mejía *et al.*, 2004), pero no causan tuberculosis pulmonar.

2.5. Diagnóstico para la tuberculosis

2.5.1. Identificación clínica

Puede ser asintomático o sintomática. La primera suele ser confirmada por baciloscopia directa o concentrada. La otra puede presentar síntomas más significativos, oligosintomática (Carraspera o escasa tos) o ser aparente. En esta forma de comienzo suele haber un síndrome llamado de IMPREGNACIÓN BACILAR. El paciente presenta por semanas o meses síntomas generales, cansancio, astenia, adinamia, anorexia, febrícula vespertina, sudoración nocturna y pérdida de peso. A este síndrome se le agregan síntomas funcionales del aparato respiratorio (Guevara *et al.*, 2003).

2.5.2. Identificación por síntomas funcionales

Los síntomas típicos son:

- A. Tos. Seca, húmeda, postural, continua, aislada; su característica depende del grado de compromiso del aparato respiratorio.
- B. Expectoración. Mucosa, mucopurulenta o hemoptoica, sin olor característico.
- C. Hemoptisis. De variada magnitud, desde esputos hasta la forma fulminante. Este síntoma debe ser diferenciado a tiempo de la hematemesis en el proceso del diagnóstico inicial.
- D. Dolor torácico. En especial localizado y a veces propagado, cuando hay compromiso pleural o mediastinal.
- E. Disnea. De diverso grado según el compromiso de la vía aérea: puede ser ligera, mediana o sofocante, o tener modificaciones del ritmo (Guevara *et al.*, 2003).

2.5.3. Identificación por otros síndromes

- A. Pseudoneumónico. Es de evolución lenta, con febrículas y se encuentran bacilos de Koch en la expectoración.
- B. Pseudogripal. Similares cuadros virales, con artralgias, mialgias y temperaturas elevadas. Es de recuperación lenta persistiendo la sintomatología lo que determina un posterior estudio más detallado del paciente.
- C. Neumotórax espontáneo. Secundario a TBC puede ser el cuadro inicial.
- D. Síndrome pleural. Habitualmente precedido por un síndrome de impregnación bacilar.

2.5.4. Identificación radiológica

Según la bibliografía consultada (Guevara *et al.*, 2003) las manifestaciones radiológicas de la TBC primaria refieren 4 patrones:

- A. Infección lobar. Es más frecuente que se halle en los lóbulos superiores. Rara vez se acompaña de derrame pleural, pero casi siempre tiene adenopatías concomitantes.
- B. Presentación ganglionar. Prácticamente representa el 90% afectando casi siempre ganglios bronquiales e hiliares, traqueo bronquial derecho así como mediastinitos.
- C. El examen radiológico permite evidenciar daños menos frecuentes como: Afectación pleural y Lesión miliar (Guevara *et al.*, 2003; Mejía *et al.*, 2004).

2.6. Protocolo para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis

Para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis se considera los siguientes aspectos:

2.6.1. Bioseguridad en la bacteriología de la tuberculosis

Para el manejo de las muestras clínicas en el laboratorio; existen normas estrictas de bioseguridad. Se conoce que la vía de transmisión principal es la respiratoria, por la inhalación de partículas aerosolizadas; éstas pueden provenir del paciente o ser diseminadas al manipular las muestras en el laboratorio (apertura de frascos, flameo del asa, etc.). El evitar el desprendimiento de estas partículas, trabajar en ambientes amplios y ventilados de circulación restringida y el recordar las normas de no fumar, beber, comer, o aplicarse cosméticos en el laboratorio, son algunos de los puntos de protección a tener en cuenta (Manual de normas de bioseguridad N°8; Lima – Perú, 2005).

2.6.2. Obtención de la muestra del paciente

Las muestras pueden provenir de zonas naturalmente estériles, zonas naturalmente contaminadas o de zonas estériles pero en las que al efectuar la toma, se pasa por un área contaminada (Manual de normas de bioseguridad N°8; Lima – Perú, 2005). Se pueden utilizar como material de estudio las secreciones o piezas de biopsias (Farga, 1995; Guevara *et al.*, 2003; Vlader *et al.*, 2003).

A. Espustos. Las muestras de esputo sirven para diagnósticos individuales o estudios colectivos examinando expectoradores de más de 2 semanas de duración. Es de gran significación el estudio del expectorado al día siguiente de la práctica endobronquial, pudiendo arrojar mayor positividad. Son necesarios 10.000 bacilos/ml de esputo para que la baciloscopía sea positiva.

Se obtiene un 76% de acierto en el diagnóstico aumentando en la segunda a 82% y a 83% en la tercera. Se agrega un 10% de rendimiento si se realiza el cultivo inicial del primer esputo, permitiendo efectuar pruebas de sensibilidad a diferentes drogas antituberculosas.

B. Contenido gástrico. Es el método ideal para recuperar del estómago las secreciones respiratorias que han sido deglutidas por el paciente que es incapaz de expectorar. Tiene más indicación en la etapa de certificar la “curación bacteriológica”. La muestra debe ser seriada durante tres días y la toma correcta es imprescindible para obtener el diagnóstico.

La metodología para la toma adecuada de la muestra de aspirado gástrico consiste en:

- a. Pasar la sonda nasogástrica la noche anterior, fijar y marcar el punto de fijación.
- b. A las 5 a.m., (sin despertar al paciente) aspirar el contenido gástrico con jeringa.

- c. Depositar el aspirado en un recipiente estéril que contenga fosfato trisódico al 10% (FTS) en una proporción de 2 ml por cada 10 ml de muestra.
- d. Instilar a través de la sonda nasogástrica 50 ml de agua destilada estéril y aspirar nuevamente.
- e. Colocar el aspirado en el mismo recipiente. La cantidad mínima recuperada debe ser de 20 ml.

C. Lavado bronquial o bronquioalveolar. Conseguídos con relativa facilidad a través del broncofibroscopio, constituyen una buena técnica para la obtención de secreciones bronquiales en sujetos con difícil expectoración y diagnóstico complejo.

D. Otros líquidos orgánicos. Dependiendo de la localización: líquido pleural, LCR, articular, pus de ganglios, orina, etc.

Se debe tener en cuenta en el caso de la meningitis tuberculosa la técnica más propicia es la inoculación al cobayo, debido a la escasa cantidad de bacterias (González *et al.*, 2003; Días *et al.*, 2005).

2.6.3. Transporte y conservación

La rapidez es una condición fundamental en el transporte pues los bacilos se debilitan con el tiempo y prolifera en caso de ser una muestra contaminada con la flora acompañante (saprofita). Ej.: proliferación de la flora del tracto respiratorio superior en la expectoración. La conservación puede hacerse a 4°C hasta 7 días (Guevara *et al.*, 2003; González *et al.*, 2003).

2.6.4. Procesamiento

El trabajo con las muestras clínicas en el laboratorio se realiza en cabina de seguridad, con las debidas protecciones para el personal (mandiles, guantes, respiradores, etc.).

2.6.4.1. Técnica de coloración

Las características tintoriales para *Mycobacterium tuberculosis* (MT) permiten su rápida visualización (baciloscopia) en muestras clínicas mediante el uso de diferentes técnicas de tinción. La presencia de abundantes ácidos grasos en su pared lo hace ser ácido-alcohol-resistente, es decir, tiene la propiedad de retener ciertos colorantes de anilina a pesar de ser tratado con un ácido y alcohol. Son dos los procedimientos más usados para la tinción: el método de la carbolfucsina, el cual incluye los métodos de Ziehl-Neelsen y de Kinyoun, y un procedimiento fluorocrómico usando coloraciones de auramina - O ó auramina-rodamina. Las técnicas fluorocrómicas con auramina-rodamina se basan en el mismo principio pero permiten una más rápida y más cómoda visualización de las micobacterias que muestran una llamativa fluorescencia amarilla-anaranjada con microscopio de campo oscuro. Con cualquiera de estas técnicas el MT se observa como un bacilo de menos de 0,5 mm de diámetro que puede formar parejas ó grupos en formas de cuerdas (Figura 09). El hecho de que MT necesite 5-20 hrs. para duplicarse explica que su cultivo tarde entre 4-8 semanas, en los medios de Löwenstein-Jensen ó de Middlebrook (Cetrángolo *et al.*, 1979; Montoto, 2001; Guevara *et al.*, 2003).

2.6.4.2. Baciloscopia

Consiste en la utilización de tinciones directas para la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), a partir de muestras de esputo, concretamente las tinciones de Ziehl-Neelsen, junto a la radiología es la prueba diagnóstica más importante para establecer un diagnóstico de sospecha. La calidad de las muestras de esputo es fundamental para la validez (sensibilidad y especificidad) de esta prueba.

La baciloscopía de esputo (examen microscópico del extendido coloreado) es considerada como el examen básico para el diagnóstico bacteriológico de la TBC humana, especialmente en su forma broncopulmonar (Díaz *et al.*, 2005).

Por su ejecución rápida, sencilla y económica, el examen microscópico de las muestras de esputo permite lograr una amplia cobertura diagnóstica, aún en regiones de escasos recursos. Su utilidad para los programas de control de la TBC en la situación epidemiológica actual en la mayoría de los países, es indiscutible.

El examen microscópico se basa en la capacidad de formar complejos coloreados con los derivados del trifenilmetano que resisten la acción del etanol- ácido (ácido-alcohol resistencia), y ésta es una característica de las micobacterias.

Los colorantes aniónicos derivados del trifenilmetano que se emplean para poner de manifiesto esta propiedad son: la fucsina y el cristal violeta. A ellos se les agrega fenol acuoso, que aumenta la penetración del colorante en los lípidos constituyentes de la pared bacilar. Las micobacterias pierden su ácido-alcohol resistencia al extraérseles su capa lipídica externa por tratamiento con etanol -álcali, o al someter a los bacilos desecados a una molienda fina. La integridad de la estructura celular y de los lípidos de su pared son esenciales para que las micobacterias conserven esa propiedad.

La baciloscopía, por la técnica de Ziehl-Neelsen es una técnica sencilla de bajo costo cuya utilidad se ha destacado en párrafos anteriores. Aplicada a la expectoración se estima que se necesitan 10.000 bacilos para que la probabilidad sea del 95 al 100%. En nuestro país el hallazgo de BAAR en la baciloscopía de muestras provenientes de áreas estériles es diagnóstica y específica de *M. tuberculosis* en un alto porcentaje. Lo mismo ocurre con las muestras de lavado gástrico, aunque se trata de muestras paucibacilares (< 10 BAAR por campo) (Guevara *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2005).

La observación debe comprender unos 100 campos microscópicos (Figura 09) y se debe informar según el siguiente criterio semicuantitativo:

- (-) = No se encuentran BAAR en 100 campos microscópicos observados.
- (+) = Menos de 1 BAAR por campo en 100 campos microscópico observado.
- (++) = Uno a 10 BAAR por campo en 50 campos microscópicos observados.
- (+++)= Más de 10 BAAR por campo en 20 campos microscópicos observados.

Manual de normas de bioseguridad N°8; (Lima – Perú, 2005).

2.6.4.3. Cultivo

Se trata de una prueba que permite establecer el diagnóstico confirmatorio mediante el hallazgo e identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. La muestra que se utiliza para el cultivo dependerá de la localización de la misma, la más habitual suele ser a través de una muestra de esputo, no obstante también puede hacerse el cultivo a partir de muestras de orina, jugo gástrico, LCR, material de biopsias ganglionares, etc.

El cultivo permite diagnosticar los casos broncopulmonares de TBC en los que el número de bacilos no es lo suficientemente alto como para poder observarlos en el examen microscópico.

En las formas extrapulmonares, que son generalmente paucibacilares (es decir que cursan con escasa población bacilar), el cultivo constituye prácticamente el único método de diagnóstico bacteriológico. Además, permite clasificar la micobacteria

aislada, lo que no es posible sólo por la observación microscópica (Resumen de actividades del comité de tuberculosis de la región metropolitana, 2001).

Para obtener el desarrollo de por lo menos una colonia en el medio de cultivo, la muestra debe contener 10 bacilos vivos por mililitro o más (Guevara *et al.*, 2003). Las micobacterias son microorganismos aerobios estrictos. Las necesidades básicas de nutrientes de las especies cultivables son sencillas: el glicerol o la glucosa como fuente de carbono, y una sal de amonio como fuente de nitrógeno. Existen medios a base de huevo y otros semisintéticos, tanto para el aislamiento primario como para los subcultivos.

La yema de huevo es un constituyente empleado para obtener medios de cultivo ricos en lípidos, por que las micobacterias tienen especial preferencia. Los medios en base de huevo están constituidos por soluciones reguladoras de fosfatos, ciertos cationes en bajas concentraciones, una fuente de carbono (glicerol), otra de nitrógeno (asparagina en el medio de Löwenstein-Jensen) o una fuente de ambos elementos (piruvato en el medio de Stonebrink). Se les agrega verde de malaquita para evitar la contaminación (Manual de normas de bioseguridad N°8; Lima - Perú, 2005).

Cuando se comenzó a conocer en profundidad el metabolismo de las micobacterias, se formularon medios semisintéticos que contienen los elementos requeridos por ellas para un buen desarrollo, tanto en el aislamiento como en los subcultivos. Estos primeros estudios fueron realizados por Dubos y Middlebrook (Farga, 1995).

El medio basal está constituido en estos medios por elementos inorgánicos, glicerol o glucosa, aminoácidos (digerido enzimático de caseína), y asparagina.

2.6.4.3.1. Desarrollo de cultivos

A continuación se señala los casos en los que se inicia un cultivo para *Mycobacterium tuberculosis*. Manual de normas de bioseguridad N°8; (Lima – Perú, 2005).

- Muestras con baciloscopía negativa que continúan con clínica compatible con TBC.
- Muestras extrapulmonares.
- Pacientes VIH positivos.
- Muestras de pacientes en los que se sospeche resistencia a las drogas antituberculosas.
- Pacientes que ingresan por primera vez al hospital o que reingresan.
- Toda muestra de paciente pediátrico, menor de 15 años con antecedentes familiares de TBC o VIH positivos.

Se trata de una prueba con una sensibilidad elevada 80-85%, y con una especificidad del 98%.) Y se requieren entre 10 y 100 bacilos por ml. para obtener un cultivo positivo, frente a los 5.000 - 10.000 necesarios para que resulte positiva una baciloscopia. (Díaz *et al.*, 2005) En raras ocasiones pueden producirse contaminaciones cruzadas de laboratorio, o errores de identificación que justifiquen falsos positivos en los cultivos (Farga, 1995).

Los cultivos pueden realizarse:

- En medios sólidos a base de huevo como el de Löwenstein-Jensen y Ogawa. El crecimiento suele tardar entre 3 y 8 semanas.
- En medios líquidos como el de Middlebrook en lo que se suele observar un crecimiento más rápido de la bacteria permitiendo obtener resultados positivos

en 1-3 semanas, aunque no se dan por negativos hasta transcurridas 6 semanas.

Para los fines del presente estudio consideraremos la siguiente clasificación para los Cultivos:

2.6.4.3.2. Cultivos convencionales (CC)

En medios sólidos a base de huevo tales como el Löwenstein - Jensen o medios sintéticos líquidos o sólidos (Middlebrook 7H9 -7H11) resultan apropiados para el desarrollo de casi todas las especies de micobacterias (Mototo, 2001; Mejía *et al.*, 2004).

Su importancia radica en que:

- A. Poseen una mayor sensibilidad que el directo confirmando la enfermedad en un porcentaje de enfermos negativos al Directo (aprox. 15 % de los casos de TBC pulmonar).
- B. Permiten el aislamiento de cepas bacterianas, punto de inicio para la identificación de especies, realización de pruebas de sensibilidad a fármacos antituberculosos y técnicas en ácidos nucleicos.
- C. Son imprescindibles para confirmar casos de TBC extrapulmonares y diferenciar patologías provocadas por micobacterias no tuberculosis (MNT).

Sin embargo no están exentos de desventajas, como:

- A. La demora en obtener desarrollo apreciable de colonias (3 a 6 semanas) propio de varias especies patógenas del género.
- B. La complejidad y el costo lo cual hace que laboratorios de baja o mediana capacidad no estén en condiciones de sustentar una técnica de este tipo.

C. Las medidas de Bioseguridad necesarias para controlar contaminación del personal.

Adicionalmente es posible afirmar que si los cultivos no se realizan adecuadamente los resultados son similares a los directos.

En estas dos últimas décadas se ha considerado como “estándar de oro” para la detección de micobacterias, utilizar un medio de cultivo sólido + un medio líquido.

2.6.4.3.3. Cultivos rápidos (CR)

El medio líquido Middlebrook 7H12, permite observar el desarrollo bacilar más rápidamente, pero tiene la desventaja de ser más fácilmente contaminado. Con el objetivo de disminuir el tiempo de proceso se han desarrollado otros sistemas de cultivo, la mayoría en medios líquidos. El primer sistema surgió hace unos 20 años y aun persiste en el mercado (Montoto, 2001; Farga, 1995).

El BACTEC 460TM, es un sistema de cultivo radiométrico que constituyó un gran avance tanto para el diagnóstico como para la determinación de la sensibilidad a los medicamentos antituberculosos. Utiliza el medio de Middlebrook 7H12 con ¹⁴C-ácido palmítico y detecta el crecimiento de las micobacterias por el CO₂ radiactivo que se desprende como producto del metabolismo del ácido palmítico. Este medio incluye este medio una solución decontaminante (PANTA: polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim, y azlocilina) y un factor de crecimiento (POES: Estearato de polioxietileno). Consigue detectar crecimiento del *M. tuberculosis* en un tiempo medio de 8 días, frente a los 20 días necesarios con medios y procedimientos

convencionales. El producto final del metabolismo bacteriano será el $^{14}\text{CO}_2$. El incremento en los niveles de este gas puede ser medido por un contador de isótopos y determinar si un cultivo es positivo.

Este sistema está definitivamente probado y se le considera de referencia como otros medios convencionales. (Tortoli *et al.*, 2004).

Ventajas

- Resultados rápidos:
 - 11 días para muestras positivas al examen directo.
 - 14 días para muestras negativas al examen directo.
- Posibilidad de realizar pruebas de sensibilidad a fármacos antituberculosos.
- Excelente recuperación de micobacterias.

Desventajas

- Costos.
- Necesidad de infraestructura adecuada para el manejo de radioisótopos.
- Mayores porcentajes de contaminación por lecturas manuales.
- Método no totalmente automatizado, requiere muchas horas / de trabajo de laboratorio.

En orden de superar estas importantes limitaciones se introdujeron al mercado, nuevos CR de tipo colorimétrico. En la actualidad se dispone de tres opciones: **El Sistema MB-BacT, el sistema MGIT y el ESP II**; muy similares entre si, básicamente estos sistemas superan al **BACTEC 460TB** en:

- Son sistemas no radiactivos, totalmente automatizados.
- Exigen menor mano de obra.
- La contaminación intra laboratorio es menor.
- Poseen una aceptable equivalencia en resultados, para todas las posibilidades.

Los CR positivos se detectan algo más lentamente (promedio 4 días) que el método radioactivo.

El sistema detecta los niveles CO₂ existentes en el frasco de cultivo. Existe desarrollo de micobacterias se genera CO₂ como producto final de metabolismo oxidativo.

- En el fondo del frasco se ubica una membrana (sensor) que cambia de color según la tensión de CO₂.
- Un haz de luz incide sobre la membrana y se refleja con diferente longitud de onda según el color de la misma.
- El haz reflejado es registrado por un aparato lector cada 10 minutos y analizado por el ordenador.
- Una vez que las lecturas sobrepasan una línea basal preestablecida se activa una alarma sonora que indica cultivo positivo.
- El equipo mantiene la incubación y lecturas durante 42 días para descartarlo entonces como "Negativo".

El aislamiento de *M. tuberculosis* en cultivo sigue siendo la clave del diagnóstico definitivo de tuberculosis, pero adolece de limitaciones, la más importante de las

cuales es su lentitud que, aunque se ha visto parcialmente resuelta con la incorporación de nuevos métodos de cultivo, sobre todo radiométricos (BACTEC-460), aún siguen siendo necesarias de dos a tres semanas para conseguir el crecimiento e identificación de *M. tuberculosis* (Díaz *et al.*, 2005; Montoto, 2001).

Se han propuesto recientemente sistemas alternativos basados en la detección del crecimiento por métodos diferentes al radiométrico, tales como la disminución de la presión de oxígeno debida al desarrollo bacilar, que se detecta por diferentes tipos de señales. Estos métodos muy probablemente sustituirán al BACTEC radiométrico, y entre ellos están el BACTALERT, BACTEC 9000, MGIT, MB-BACT y ESP, producidos por los Laboratorios Becton Dickinson y por Laboratorios DIFCO.

2.6.4.4. Nuevos métodos de identificación de *Mycobacterium tuberculosis*

A. Pruebas de bacteriófagos. Dentro de los nuevos métodos de identificación ha aparecido, recientemente, la aplicación de bacteriófagos con afinidad específica por las micobacterias. Desde 1947 se han descrito más de 250 micobacteriófagos. No obstante, tan sólo dos métodos, el LRP (Luciferase Reporter Phage) y el FASTPlaqueTB (Biotech Laboratories Ltd., Ipswich, Reino Unido) o PhageTeK MB (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) han demostrado tener cierta utilidad clínica. Estos métodos se diferencian básicamente en la detección de las células micobacterianas infectadas por el fago. En el LRP se utiliza la emisión de luz que es codificada por el gen de la luciferasa, el cual se encuentra incorporado en el genoma del fago. Esta enzima es un indicador de la presencia de células micobacterianas viables. En el FASTPlaqueTB o PhageTeK MB, la detección se basa, tan sólo, en la presencia de múltiples células micobacterianas infectadas viables tras una amplificación fágica (mycobacteriofago D29) en *Mycobacterium smegmatis*.

El LRP ha demostrado ser útil en la diferenciación entre *M. tuberculosis* y las MNT a partir de cultivo y en las pruebas de sensibilidad a la isoniazida y rifampicina. El FASTPlaqueTB o PhageTeKâ MB son productos comerciales para el diagnóstico de la tuberculosis en muestras respiratorias, así como para la realización de pruebas de sensibilidad a la rifampicina en aquel microorganismo. En general, se trata de técnicas sencillas que requieren poco entrenamiento técnico, rápidas (48h) y relativamente económicas. Sin embargo, se deben tener en cuenta los diversos problemas de sensibilidad y especificidad observados en los escasos estudios realizados. Por ello, una posible aplicación de estos métodos en laboratorios con recursos limitados, especialmente en países en desarrollo, debería reservarse a los pacientes con baciloscopía negativa y siempre con una elevada sospecha clínica de padecer tuberculosis (Burgos, 2004; Mole *et al.*, 2001).

B. Prueba de reducción de nitratos (NRA). La prueba de reducción de nitratos a nitritos ha sido utilizada como prueba de tipificación para las micobacterias, en base a la capacidad que presentaban algunas especies de reducir nitratos a nitritos; en un principio se utilizó tiras reactivas las cuales eran colocadas en una suspensión de micobacterias en suero fisiológico.

También se emplea para la diferenciación de micobacterias, solución acuosa de nitrato de sodio (NaNO_3) 0.01M, para lo cual se realiza una resuspensión de las micobacterias con 2 ml del nitrato para finalmente agregar el reactivo de Griess, cuyo resultado positivo se evidencia por un viraje de color que va desde ROSADO - VIOLETA. Esta prueba de identificación es empleada actualmente, pero cabe señalar que para poder realizar esta prueba se requieren de cultivos con 2+ de crecimiento, con colonias disgónicas (crece pobremente colonias pequeñas de menos de 1mm. de diámetro) o eugónicas (crecimiento profuso); por lo tanto es necesario esperar 45 días en promedio para realizar esta prueba e identificar a la especie.

La prueba de Nitrato reductasa o “Nítrate reductasa assay” (NRA) adiciona al medio de cultivo un componente más como es el KNO_3 (Angeby *et al.*, 2002; Paniotov *et al.*, 2002). El nitrato va ser consumido por las micobacterias como parte normal de su ruta metabólica, sin inhibir el crecimiento; por lo tanto esta prueba puede convertirse en una opción conveniente, rápida y de bajo costo para diagnóstico de la tuberculosis y pruebas de susceptibilidad de a drogas de primera línea como rifampicina e isoniazida (las dos drogas antituberculosas más importantes) (Tablas 14 y 15). Luego de ser incubados de 7 – 10 días se observó cambio de color (Montoso *et al.*, 2000; Paniotov *et al.*, 2002; Sethi *et al.*, 2004).

Actualmente se están realizando estudios similares donde se considera a la prueba NRA como altamente sensible y específica, similares ensayos se están realizando en diversos países como Cuba, pero aún se esta exactificando con estudios de REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD, para poder ser utilizada para diagnóstico clínico (Lemus, 2005). Comunicación personal

C. Pruebas fenotípicas. Hace algo más de 10 años el desarrollo tecnológico permitió la aparición de métodos de amplificación genética (AG) que fueron rápidamente introducidos para el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. Las pruebas de biología molecular actualmente en uso en el laboratorio para el diagnóstico de tuberculosis son AMTDT (Gen-Probe), basado en la amplificación enzimática del RNA ribosómico, AMPLICOR (“*Mycobacterium tuberculosis* PCR test, Roche Diagnostic Sytems”) basado en la amplificación del DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa y el LCR (“LCR *Mycobacterium tuberculosis* assay, Abbott Laboratorios”), sistema de amplificación que utiliza la reacción de la ligasa. Aportaciones recientes, todavía no generalizables, son la PCR múltiple para identificación en una misma muestra de diferentes especies micobacterianas y, sobre todo, la posibilidad de detectar en la muestra clínica genes de resistencia a los distintos tuberculostáticos de primera línea (Rosino *et al.*, 1998).

Ventajas

- Mayor sensibilidad que el cultivo.
- Exquisita especificidad (en condiciones óptimas de trabajo donde se descarta una probable contaminación)
- Permite conocer rápidamente la micobacteria presente en la muestra y consecuentemente instaurar el tratamiento más adecuado.

Desventajas

- Posibilidad de formación de aerosoles con amplicones que causen falsos resultados positivos.
- Necesidad de trabajar en ambientes separados dentro del laboratorio.
- Uso de ropa exclusiva en cada ambiente.
- Sistemas de destrucción de amplicones ya sea por métodos químicos, enzimáticos o radiométricos.

2.6.4.5. Pruebas bioquímicas para las micobacterias

En la práctica, la identificación de las micobacterias se realiza mediante pruebas bioquímicas, ya sea de detección de productos del metabolismo, de actividad enzimática o de desarrollo en presencia de ciertos compuestos. Para las primeras (ej: Niacina) debe emplearse un cultivo de aproximadamente 4 semanas de desarrollo; para las pruebas enzimáticas los cultivos deben ser abundantes y

hallarse en desarrollo activo, lo que se obtiene en unas 3 semanas, en las especies de crecimiento lento (Guevara *et al.*, 2003).

A. Niacina

Esta reacción se basa en la capacidad de ciertas micobacterias para producir ácido nicotínico, como producto metabólico, en cantidad suficiente para ser detectado. El ácido nicotínico reacciona con el bromuro de cianógeno dando lugar a una sustancia que al unirse a una amina aromática como la anilina, forma un compuesto final de color amarillo ó violáceo con bencidina (Guevara *et al.*, 2003).

B. Catalasa

Se basa en la capacidad de ciertas micobacterias para descomponer enzimáticamente el peróxido de hidrógeno, liberando oxígeno molecular gaseoso en forma de burbujas que forman una espuma persistente. Existen diferentes enzimas catalasas, el complejo *M. tuberculosis* sólo posee una catalasa termosensible, mientras que la mayoría de las micobacterias atípicas o no tuberculosas poseen además catalasas termoresistentes. En base a esto se puede diferenciar el complejo *M. tuberculosis* del resto de las micobacterias, pero no diferenciar entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Las mutantes resistentes a INH del complejo *M. tuberculosis*, pueden perder su actividad catalásica.

C. Reducción de nitratos

Se basa en la capacidad de ciertas micobacterias para producir la enzima nitrato reductasa y reducir nitratos a nitritos. Una vez que se ha identificado la cepa como del complejo *M. tuberculosis*, es una de las pruebas más importantes para diferenciar *M. tuberculosis* (nitrato reductasa positivo) de *M. bovis*, que no produce esta enzima (Manual de normas y procedimientos técnicos en bacteriología de la tuberculosis, 1986).

2.7. Incidencia de la tuberculosis

La tuberculosis sigue planteando en la actualidad importantes problemas epidemiológicos, de diagnóstico clínico, microbiológico y terapéutico, por la alta incidencia de la enfermedad en los países en vías de desarrollo, entre los que la tuberculosis constituye una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad, y el impacto que sobre ella está teniendo la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana. La tuberculosis está incrementándose en casi todo el mundo tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, debido al tratamiento inadecuado de los enfermos, la epidemia del VIH/SIDA, la resistencia a los fármacos antituberculosos, ineficientes programas de control, deterioro de las condiciones socio-económicas, aumento de la pobreza en grupos de población, y debilidad del apoyo político y económico.

Un tercio de la población mundial del planeta está infectado por *Mycobacterium tuberculosis*, de ellos, cada 8 millones de personas desarrollan la enfermedad TBC, en el 95% de los cuales se encuentra en países pobres. Para el año 2006 se estima existan más de 10 millones de enfermos por TBC y un 14% de los cuales serían personas con comorbilidad por TBC/VIH. Cada año casi 3 millones de enfermos fallecen por TBC y ellos un 14% serían personas con TBC y VIH-TBC es un problema de países como el Perú (Figura 13) (Resumen de actividades del comité de tuberculosis de la Región Metropolitana, 2001).

El Perú está considerado como el país con mayor severidad de TBC en América, teniendo las tasas anuales de morbilidad e incidencia mayores de América y es uno de los 25 países con mayor carga mundial. Para empeorar la situación, Perú está atravesando desde fines de los años 1990 y principios de los años 2000 un incremento estadísticamente significativo de la TBC drogoresistente y TBC multiresistente (TBC-MDR). El Perú es actualmente uno de los 8 países con mayor tasa anual de TBC-drogoresistente en el mundo se estima que la tasa

anual de TBC-MDR en Perú es de 10-15 por 100,000 habitantes. El 3% de los enfermos de TBC pulmonar frotis positivo (TBP-FP) que tiene TBC por primera vez es poseedor de TBC-MDR (MDR en pacientes nuevos anteriormente denominado TBC-MDR inicial o primaria). Asimismo un 12-33% de los pacientes TBC-FP y con antecedentes de tratamiento anterior tiene TBC-MDR.

Este panorama ha generado la aparición de múltiples técnicas microbiológicas, radiométricas moleculares cuya utilización permite disminuir el tiempo y mejorar el diagnóstico; aunque estas técnicas presentan altos costos, se han desarrollado técnicas para disminuir el tiempo de detección del crecimiento en el cultivo, como la detección microscópica de colonias en agar Middlebrook 7H11, así como técnicas Moleculares y Genéticas ya descritas.

Aún en la actualidad el cultivo es el método bacteriológico más sensible y específico de los que se conocen en la actualidad para detectar la presencia de micobacterias en una muestra determinada, ya que permite diagnosticar los casos de TBC broncopulmonar en los que el número de bacilos eliminados en las secreciones no es suficientemente alto y en las formas extrapulmonares constituye prácticamente el único método de diagnóstico bacteriológico ya que se tratan de muestras paucibacilares. Y permite a partir de la cepa aislada identificar bioquímicamente a las micobacterias. (Prat *et al.*, 2000)

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

Laboratorio Central de Tuberculosis del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.

3.2. Período de muestreo

De Marzo a Setiembre del 2005.

3.3. Número de muestras estudiadas

Se analizaron un total de 120 muestras de pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de tuberculosis pulmonar.

Las muestras analizadas fueron (esputo, aspirado bronquial, lavado bronquial, aspirado gástrico) Dichas muestras fueron mantenidas a temperatura de 3-4°C por 3 días para su posterior tratamiento de descontaminación antes de ser inoculadas en el medio convencional de Löwenstein-Jensen (Manual de normas de bioseguridad N°8; Lima – Perú, 2005).

Se tomó como muestra patrón la cepa *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37Rv).

3.4. Tipo de estudio

Se consideró un estudio de tipo Experimental, Prospectivo – Comparativo.

La determinación del tamaño muestral de la población en estudio se realizó bajo los siguientes criterios:

3.4.1. Criterios de inclusión

Pacientes con tuberculosis pulmonar (casos), confirmado bajo 2 criterios: sintomáticos respiratorios (SR) o examen radiológico anormal (Reacción anormal).

- A. Pacientes con baciloscopia directa y baciloscopia concentrada positivas y negativas.
- B. Muestras provenientes en su mayoría del tronco pulmonar, como son: esputo, aspirado bronquial, lavado bronquial.

C. Muestras de aspirado gástrico de pacientes VIH (+) y menores de 15 años (pediátricos).

3.4.2. Criterios de exclusión

A. No se consideró para la selección de las muestras a pacientes con tuberculosis extrapulmonar.

B. No se consideró las baciloscopías directas con menos de 10 BAAR (paucibacilares) en 100 campos de observación.

Se consideró los controles positivo y negativos por cada caso (paciente TBC positivo)

CASOS

CONTROL POSITIVO

Cepa patrón H37Rv en medio Löwenstein-Jensen modificado con nitrato de potasio mantenida durante el tiempo de cultivo.

CONTROL NEGATIVO 1

Solución salina inoculada en el medio Löwenstein-Jensen modificado con nitrato de potasio pero sin inóculo.

CONTROL NEGATIVO 2

Solución salina inoculada en el medio de cultivo Löwenstein-Jensen modificado con nitrato de potasio el mismo día de la lectura. Este control se hizo para comprobar la buena calidad del medio de cultivo.

3.5. Procedimiento

3.5.1. Recepción de muestras

Las muestras fueron recepcionadas en frascos estériles evitándose la contaminación con la flora saprofita de las mucosas y con el agua corriente para eliminar la aparición de falsos positivos en la tinción o en el cultivo; luego fueron mantenidas a 3-4 °C por 24-72 horas.

3.5.2. Examen Directo ó Frotis

Luego de ser debidamente recolectadas las muestras, se les realizó un frotis (coloración Zielh-Neelsen); (Baciloscopía Directa / Baciloscopía concentrada) considerado como el examen básico para el diagnóstico bacteriológico, especialmente en su forma broncopulmonar.

3.5.3. Preparación del medio de cultivo Löwenstein-Jensen modificado con nitrato de potasio

Al cultivo convencional de Löwenstein-Jensen, se le agregó 4.57ml de nitrato de potasio al 35% por lote. Antes de proceder a la coagulación del medio.

3.5.4. Cultivo de las muestras procesadas en el medio Löwenstein-Jensen modificado con NO₃K al 35%

Se sembraron 0.2ml por tubo de medio (n=3). Se consideraron los controles positivos en medio Löwenstein-Jensen modificado (n=3) y convencional (n=2), control negativo 1 y control negativo 2. El número de tubos necesarios por cada

muestra fue de 2, pero por seguridad en el presente estudio se ha hecho por triplicado por tratarse de un medio de cultivo modificado.

Los inóculos se ajustaron a 1.0 por comparación con el tubo N° 10 (3000 m.o/ml) empleando la escala de Mac farland, luego fueron incubados a 37 °C con las tapas ligeramente aflojadas, luego de 2 días las tapas fueron ajustadas. Todos los cultivos continuaron en incubación por 7, 10, 14 días; se realizaron evaluaciones para la determinación de la producción de nitritos a los 7, 10 y 14 días empleando el reactivo de Peter Griess, el cual permite detectar la presencia de nitritos en el medio de cultivo agregando 0.5 ml a cada tubo, produciendo un viraje instantáneo al color rojo del medio lo que indica la presencia de nitritos, que se clasificó de la siguiente manera: Rosado pálido (+), rojo (++) , rojo grosella (+++ a +++++).

En el caso de los cultivos en medio Löwenstein-Jensen convencional también fueron leídos a los 7, 10 y 14 días para la determinación de nitritos en el medio, la evaluación continuó hasta los 30 y 60 días después de la siembra tiempo en el cual ya se pudo observar crecimiento típico de *Mycobacterium tuberculosis*.

Para la lectura en los medios de cultivo se consideraron las siguientes calificaciones:

(-) = No se observan colonias.

(N°) = Número total de colonias, si hay menos de 20.

(+) = De 20-100 colonias.

(++) = Colonias separadas más de 100.

(+++) = Colonias Confluentes (Se observa desarrollo en toda la superficie del medio).

C = Contaminado.

Manual de normas de bioseguridad N°8; (Lima - Perú, 2005).

3.5.5. Pruebas confirmativas para *Mycobacterium tuberculosis*

Las muestras positivas para la producción de nitritos se cultivaron en:

A. Niacina

Como *M. tuberculosis* y en general todas las micobacterias producen ácido nicotínico (niacina) esta prueba permite detectar la niacina acumulada en cultivos con crecimiento (2 a más cruces), se rompió el medio con la ayuda de una espátula luego se agregó 1ml de agua destilada al medio de cultivo por 15 minutos. El líquido es retirado del medio con ayuda de una pipeta y se trasvasó a otro tubo donde se agregó los siguientes reactivos:

- a. Bromuro de cianógeno, solución acuosa al 10%.
- b. Solución alcohólica de benicidina o de anilina al 4%.

Se agregó 1 ml. Al tubo en igual proporción (1:1) a cada tubo, dejando reposar unos minutos.

Prueba positiva: coloración amarilla.

Prueba negativa: incoloro o no viraje de color.

B. Prueba de catalasa (a temperatura ambiente y a 68°C)

Como la catalasa es una enzima intracelular soluble es capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, aquí se empleó la cepa de 30 días de crecimiento con 2 cruces.

Se cogió aproximadamente 1mg. de la colonia y se trasvasó a tubos con los buffers (buffer di sódico 61.1ml/100ml y buffer monopotásico 38.9ml/100ml), 0.5ml a cada tubo dejando actuar por 20 minutos a temperatura ambiente y a 68°C.

Luego se agregó 0.5ml de la mezcla de peróxido de hidrógeno y Tween 80 al 10% en igual volumen.

Prueba positiva: formación de burbujas (desprendimiento de H₂O y O₂).

Prueba negativa: no hay formación de burbujas.

Generalmente se realizan las pruebas de tipificación: con muestras procedentes de pacientes con tuberculosis multidrogorresistente (MDR), pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH+), cepas atípicas, muestras extrapulmonares, debido a que el presente estudio tiene por objeto establecer una metodología para el diagnóstico presuntivo (rápido) de *Mycobacterium tuberculosis* se han hecho las pruebas de tipificación para todos los casos.

3.5.6. Análisis estadístico

Los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba, así como la validez predictiva positiva y negativa fueron calculados mediante el análisis de validez de pruebas diagnósticas (Análisis de frecuencias) (López *et al.*, 2003). Las demás variables fueron evaluadas por medio del Análisis discriminante por elaboración de gráficas empleando el programa Microsoft Excel 2000.

A. Calculo de la sensibilidad y especificidad de la Prueba de la Nitrato Reductasa (Löwenstein-Jensen modificado)

Se calcula sensibilidad (S), especificidad (E), prevalencia (P), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN).

S, E y P son simples razones de cantidades de enfermos encontrados con la prueba estándar (prueba Löwenstein-Jensen convencional) y los encontrados con la prueba Löwenstein-Jensen modificada.

S, E y P miden las probabilidades de encontrar enfermos o no enfermos al escoger un paciente al azar entre el grupo muestral (120 personas). Variables consideradas:

P1: prueba bacilosκόpica

P2: prueba L-J modificada

P3: prueba L-J convencional, que servirá como estándar de oro.

Y : número de enfermos según P1

X : número de enfermos según P2

Z : número de enfermos según P3

120 - Y: número de no enfermos según P1

120 - X: número de no enfermos según P2

120 - Z: número de no enfermos según P3

Se simboliza la función de número de elementos de un conjunto como:

N (conjunto) y al operador de conjunción o producto de conjuntos con: \mathfrak{C}

Ahora se puede encontrar los siguientes casos de P3 y P2 combinados, en la muestra, teniendo en cuenta que P3 es la prueba de referencia para P2:

A los pacientes se simboliza como:

EP3: pacientes enfermos según la prueba P3

EP2: pacientes enfermos según la prueba P2

\sim EP2: pacientes no enfermos según la prueba P2

\sim EP3: pacientes no enfermos según la prueba P3

Como hay superposiciones entre estos datos, es decir hay pacientes que son detectados en las dos o tres pruebas como enfermos o no enfermos al mismo tiempo y también los hay pacientes que aparecen solo en una prueba como tales.

Es necesario usar la Teoría de Conjuntos (Figura 07) para separar cada componente específico de pacientes del siguiente modo:

a: Número de enfermos según las dos pruebas (P3 y P2), o sea pacientes que aparecen como enfermos en ambas pruebas o sea

$$a = N (EP3 \cap EP2)$$

b : Número de falsos positivos (no enfermos según P3 pero sí según P2) o sea

$$b = N(\sim EP3 \cap EP2)$$

c : Número de falsos negativos (enfermos según P3 pero no según P2) o sea

$$c = N (EP3 \cap \sim EP2)$$

d : Número de no enfermos según las dos pruebas (P3 y P2) o sea pacientes que aparecen como no enfermos en ambas pruebas:

$$d = N (\sim EP3 \cap \sim EP2)$$

Ahora la teoría de Conjuntos nos asegura que: $a + b + c + d = 120$

Notar que los EP3, EP2, $\sim EP3$, $\sim EP2$ no son números sino subconjuntos.

La Sensibilidad (S)

$$S = \frac{a}{a + c} \times 100$$

Esto nos da un número menor a 1, que mide el grado de discrepancia relativa de la prueba P2 respecto a P3 es decir cuán sensible es P2 respecto a P3.

Si c fuera cero entonces S sería 100% y la prueba P2 sería igual de sensible que P3.

Sensibilidad significa capacidad de detectar al enfermo sin pasarlo por alto.

Por eso S es la probabilidad de que un enfermo sea detectado por P2.

Ahora se calcula la **Especificidad (E)**

$$E = \frac{d}{d + b} \times 100$$

Esto nos da un número igual a 1, que indica igualdad de las prueba P2 respecto a P3 es decir ambas son igualmente específicas.

Si b no hubiese sido cero entonces la prueba P2 sería menos específica que P3.

Específico, significa capacidad de detectar al no enfermo sin confundirlo con un enfermo. Por eso E es la probabilidad de que un no enfermo sea detectado como tal por P2.

Se calcula ahora la **Prevalencia (P)**

$$P = \frac{a + c}{a + c + d + b} \times 100;$$

Nótese que (a + b + c + d) es el total de pacientes, todos enfermos según diagnóstico médico, y (a + c) es el total de enfermos detectados. Eso significa que P es la probabilidad de que un paciente esté enfermo y detectado como tal.

Prevalencia, significa capacidad de detectar a los enfermos respecto al total de pacientes.

Para calcular los valores predictivos positivos y negativos de la prueba P2 es necesario primero darse cuenta de su significado:

Valor Predictivo Positivo (VPP), significa la capacidad de detectar un enfermo sin pasarlo por alto dentro de toda la muestra. Es 100% si la discrepancia $(1-E)$ $(1-P)$ es cero

Valor Predictivo Negativo (VPN), significa la capacidad de detectar un no enfermo sin pasarlo por alto dentro de toda la muestra. Es 100% si la discrepancia $(1-S)$ (P) es cero.

Ambas fórmulas se pueden simplificar reemplazando los valores S, E y P en función de a, b, c y d, en valor absoluto, y se halla que:

$$\text{VPP} = \frac{1}{1 + (b / a)} \times 100$$

Es la que corresponde al Valor Predictivo positivo.

$$\text{VPN} = \frac{1}{1 + (c / d)} \times 100$$

Es la que corresponde al Valor Predictivo negativo.

La sensibilidad y especificidad no son afectadas por la prevalencia.

VPP y VPN son afectados por la prevalencia, llamada también probabilidad a priori.

Existe una relación entre el VP y la Prevalencia:

VPP: Aumenta cuando aumenta la prevalencia y disminuye cuando disminuye la prevalencia (Relación directamente proporcional).

VPN: Aumenta cuando disminuye la prevalencia y disminuye cuando aumenta la prevalencia (Relación inversamente proporcional).

Entonces si el VPP es de 0,5, se puede estar o no estar enfermo, ya que ello equivale al 50%, no es una buena fórmula, nuestro juicio es del 50%, si pasa del 50% estamos superando el azar y sí sería válido.

B. Calculo de la probabilidad de que un paciente positivo haya sido detectado por la Prueba de la Nitrato Reductasa (Löwenstein-Jensen modificado)

Se puede aplicar el **Teorema de Bayes** para juzgar con exactitud los méritos relativos de ambas pruebas entre sí.

Las variables que se consideran son:

$p(P2 \mid \text{positivo})$: probabilidad de que un paciente escogido al azar dé positivo y haya sido detectado por la prueba P2.

$p(\text{positivo} \mid P2)$: probabilidad de que un paciente usando la prueba P2 dé positivo.

$p(\text{positivo})$: probabilidad de que este paciente dé positivo.

$p(P2)$: probabilidad de usar la prueba P2, vale inicialmente 0.5 porque se usan solo dos pruebas P2 y P3.

$p(P3)$: probabilidad de usar la prueba P3, vale inicialmente 0.5 porque se usan solo dos pruebas P2 y P3.

El teorema de Bayes establece que la probabilidad de que un paciente positivo haya sido detectado por la prueba P2 producirá un cambio en la probabilidad de la prueba P2 desde su valor original = 0,5, disminuyendo si es menos sensible que P3 y aumentando si es más sensible que P3. Este teorema permite calcular cuanto cambia esta probabilidad:

$$p(P2 | \text{pos}) = \frac{p(P2) \times p(\text{pos} | P2)}{p(P2) \times p(\text{pos} | P2) + p(P3) \times p(\text{pos} | P3)}$$

(Pos: positivo)

Las variables consideradas son:

$p(P2 | \text{negativo})$: probabilidad de que un paciente escogido al azar dé negativo y haya sido detectado por la prueba P2.

$p(\text{negativo} | P2)$: probabilidad de que un paciente usando la prueba P2 dé negativo .

$p(\text{negativo})$: probabilidad de que este paciente dé negativo.

$p(P2)$: probabilidad de usar la prueba P2, vale inicialmente 0.5 porque se usan solo dos pruebas P2 y P3.

$p(P3)$: probabilidad de usar la prueba P3, vale inicialmente 0.5 porque se usan solo dos pruebas P2 y P3.

$$p(P2 | \text{neg}) = \frac{p(P2) \times p(\text{neg} | P2)}{p(P2) \times p(\text{neg} | P2) + p(P3) \times p(\text{neg} | P3)}$$

(neg: negativo)

C. Validez estadística de la Prueba de la Nitrato Reductasa (Löwenstein-Jensen modificado) para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar

Para establecer que nuestra hipótesis es verdadera debemos tener en cuenta los tiempos TAT (tiempos acumulados) es decir del ciclo de las pruebas P2 y P3, para exactificarlo, para lo cual calculamos para las dos pruebas el tiempo esperado de detección, es decir el promedio ponderado del tiempo transcurrido para la detección de todos los enfermos registrados comunes a ambas pruebas.

Prueba P2 (rápida)

6 enfermos a 7 días
24 enfermos a 10 días
38 enfermos a 14 días

Prueba P3 (lenta)

86 enfermos a 30 días
91 enfermos a 60 días

P2: $(7 \text{ días} \times 6 \text{ pos.}) + (10 \text{ días} \times 24 \text{ pos.}) + (14 \text{ días} \times 38 \text{ pos.}) / 64 \text{ pos.}$

P3: $(30 \text{ días} \times 86 \text{ pos.}) + (60 \text{ días} \times 91 \text{ pos.}) / 177 \text{ pos.}$

IV. RESULTADOS

4.1. Determinación de *Mycobacterium tuberculosis* por baciloscopia

Del total de muestras analizadas de acuerdo a su origen, 105(87.5%) correspondían esputo, 10(8.3%) a aspirado bronquial, 4(3.3%) de aspirado gástrico, 1(0.84%) a lavado bronquial. Como se observa (Tabla 02), las muestras

de esputo representaron el mayor porcentaje del total de muestras analizadas, las cuales presentan alta carga bacilar calificada como buena muestra para diagnóstico de tuberculosis pulmonar.

Las muestras de esputo fueron clasificadas como: con saliva, mucoide, hemoptóica y mucopurulenta, siendo más frecuentes aquellas de aspecto mucopurulento (46% del total de muestras de esputo) (Tabla 03), lo cual no afecta significativamente el grado de positividad, de las muestras en el cultivo Löwenstein-Jensen modificado (Figura 02).

De las 120 muestras procesadas, 93 fueron positivas y 27 negativas a las pruebas de baciloscopia (Tabla 04) y cultivo convencional (Tabla 05).

Del total de exámenes directos realizados a las 120 muestras estudiadas, 57(47.5%) fueron de baciloscopia directa y de 63(52.5%) de baciloscopia concentrada (Tabla 04). La baciloscopia concentrada se hizo a las muestras diferentes a esputo o cuando la baciloscopia directa fue negativa.

De las muestras procesadas para baciloscopia directa, 43 fueron positivos y 14 negativos (Tabla 04). De las muestras positivas en 1 a 5 cruces, observándose que 16 fueron P+, 14 P++, y 13 P+++ (Figura 01).

De las muestras tratadas para baciloscopia concentrada, 50 fueron positivas y 13 negativas (Tabla 04).

Se ha comparado el número de muestras positivas mediante baciloscopia directa con el número de baciloscopias positivas mediante cultivo Löwenstein-Jensen modificado (prueba de nitrato reducción), Löwenstein-Jensen convencional, observándose que el mayor número de muestras positivas se obtiene mediante Löwenstein-Jensen convencional, en tanto que la positividad en medio Löwenstein-Jensen modificado es similar a la baciloscopia directa. Sin embargo, la positividad en Löwenstein-Jensen modificado se refiere al diagnóstico e

identificación de *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras, no siendo mediante baciloscopia directa.

4.2. Determinación de *Mycobacterium tuberculosis* por cultivo

En los métodos comparados, Löwenstein-Jensen convencional y Löwenstein-Jensen modificado o prueba de nitrato reducción, se obtuvieron los siguientes resultados:

Del total de las muestras que pasaron a cultivo, previo desarrollo del examen baciloscópico, en la prueba Löwenstein-Jensen convencional 93 muestras fueron positivas y 27 negativas, en tanto que con la prueba Löwenstein-Jensen modificado, 38 muestras dieron positivo y 82 negativo (Tabla 05). En ambas pruebas se clasificó el grado de positividad en cruces; resultando la mayoría de las muestras en cultivo Löwenstein-Jensen modificado, con 1 cruz de positividad (15.8%) (Figura 03); mientras que en la prueba Löwenstein-Jensen convencional la mayor parte de las muestras (50%) se reportaron con dos cruces de positividad (Tabla 05 y Figura 02).

Luego del cultivo de las muestras en el medio Löwenstein-Jensen convencional y modificado, estos fueron revelados, con el reactivo de Peter Griess a los 7, 10 y 14 días posterior a la siembra. Los tubos con medio Löwenstein-Jensen convencional dieron negativo, mientras que los tubos con medio Löwenstein-Jensen modificado dieron positivo a los 10 días produciendo un viraje de color por la detección de los nitritos presentes en el medio de cultivo, debido al crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*. La positividad se muestra en la Figura 03. La mayoría de las muestras produjo una cantidad baja de nitritos (1+), lo cual se evidencia cualitativamente con un viraje al color rosa pálido (figura 06), en cambio en el medio Löwenstein-Jensen convencional se obtuvo (2+) en promedio en el recuento de colonias.

La mayoría de los cultivos en Löwenstein-Jensen modificado fueron positivos a la prueba de la nitrato reducción a los 10 días (18 tubos), (Figura 04), los que corresponden al 47.4% del total de tubos positivos obtenidos con el cultivo modificado.

4.3. Resultados del análisis estadístico de validez de criterio para la Prueba de Reducción de Nitratos (Löwenstein-Jensen modificado)

Se obtuvo lo siguiente:

Número de pacientes verdaderos positivos: 38; falsos positivos: 0, falsos negativos: 55, verdaderos negativos: 27. Se determinó una sensibilidad de 41%, especificidad del 100% (Tabla 06).

En el estudio de la validez predictiva se obtuvo: Valor predictivo positivo del 100%, valor predictivo negativo del 34% y una prevalencia de 77.5% (Tabla 06).

Se observó que la prueba Löwenstein-Jensen modificada es menos sensible comparada con la prueba Löwenstein-Jensen convencional ya que tiene 41% (Tabla 06), en cambio el medio Löwenstein-Jensen convencional 84%.

La prueba de Löwenstein-Jensen modificada es más específica (100%) que la prueba Löwenstein-Jensen convencional (98%), y hay menor riesgo de resultados falso positivos (Tabla 06). El medio Löwenstein-Jensen modificado tiene un buen valor P (prevalencia), cercano al óptimo, lo que la compara bastante bien con la prueba Löwenstein-Jensen convencional, logrando un VPP es igual al de la prueba convencional porque el número de falsos positivos es cero, mientras que su VPN es bajo por el alto número de falsos negativos debido a su poca sensibilidad.

Por medio del teorema de Bayes se observó que la probabilidad de que un paciente escogido al azar resulte positivo y haya sido detectado por la prueba Löwenstein-Jensen modificada ($p(P2 | \text{positivo})$) es de 29.46%, por lo cual existe la probabilidad de que la prueba Löwenstein-Jensen modificada disminuya de 0.5

a 0.3 debido a su menor SENSIBILIDAD comparativa con respecto a la prueba convencional. Mientras que la probabilidad de que un paciente escogido al azar resulte negativo y haya sido detectado por la prueba Löwenstein-Jensen modificada ($p(P2 | \text{negativo})$) es de 74%, por lo tanto la probabilidad de la prueba Löwenstein-Jensen modificada aumenta de 0.5 a 0.74 debido a su mayor ESPECIFICIDAD comparativa con relación a la prueba convencional (Tabla 10).

Al calcular los tiempos esperados (promedio ponderado) obtenemos los siguientes resultados: 12 días en promedio y 45 días en promedio. (Tabla 08)

4.4. Tipificación de las cepas sospechosas de *Mycobacterium tuberculosis*

Mediante las pruebas de tipificación, (Figura 08), se pudo comprobar que las cepas evaluadas correspondían a *Mycobacterium tuberculosis* el 98.9%. Se identificó por método bioquímico una cepa de *Mycobacterium chelonae* que mostró crecimiento rápido y procedió de un paciente de oncología, que representa el 1.1% (Tabla 11). También se observó desarrollo de colonias al 100% en las 93 muestras positivas evaluadas por el método presuntivo.

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio sobre la evaluación del cultivo de muestras de pacientes sospechosos de padecer tuberculosis en medio Löwenstein-Jensen modificado, en el que se hace la prueba de reducción de nitratos para el diagnóstico presuntivo de *M. tuberculosis*, en comparación con el cultivo en Löwenstein-Jensen convencional, en el que el diagnóstico se hace sobre la base de la aparición de

colonias de esta bacteria, los resultados obtenidos revelan que la técnica modificada tiene una alta especificidad (100%), la cual es mayor que la de la técnica convencional (95%) (Tabla 06). Esto significa que mediante la técnica modificada ninguna muestra negativa es determinada como positiva, por lo tanto se obtiene un 0% de falsos positivos, no existen datos similares con los que se pueda contrastar los resultados.

Por otro lado, el cultivo en Löwenstein-Jensen modificado no resultó ser muy sensible en relación al cultivo en Löwenstein-Jensen convencional, porque se determinó una sensibilidad del 41%, en tanto que la sensibilidad del cultivo en Löwenstein-Jensen convencional fue de 95% (Tabla 06). Díaz *et al.* (2005), reporta también para la técnica convencional una sensibilidad del 95%, pudiendo dar cerca del 60% de falsos negativos.

Del análisis estadístico se ha determinado que la validez predictiva de esta prueba (valores predictivos), así como la especificidad y sensibilidad (Tabla 07) son correspondientes a los resultados obtenidos mediante el teorema de Bayes lo cual confirma que la prueba de la nitrato reductasa en medio Löwenstein-Jensen modificada aumenta en especificidad en 0.24, pero disminuye en 0.2 la sensibilidad con relación al método de cultivo Löwenstein-Jensen convencional (Tabla 10).

Asimismo, mediante el análisis de validez de criterio se observó con más claridad que el valor predictivo positivo es de 100% porque el número de falsos positivos es cero, por lo que existe igualdad entre Löwenstein-Jensen convencional y Löwenstein-Jensen modificado respecto a su capacidad predictiva positiva. Al ser este valor mayor al 50% significa que está superando el azar, por lo tanto la prueba es válida para detectar los casos positivos (enfermos). También se observa claramente que el valor predictivo negativo (VPN) es de 34% debido a los falsos negativos generados por la baja sensibilidad. Al ser el VPN menor al 50% significa que no supera el azar, entonces la prueba no es adecuada para detectar los sanos produciendo resultados falsos positivos (no enfermos).

Al analizar los factores que pudieron influir en la baja sensibilidad, consideramos que no se debió a la carga bacilar, ya que los resultados (Tabla 02), señalan que la mayor cantidad de muestras analizadas fueron esputos (87.5%) del total de muestras estudiadas, los cuales presentan alta carga bacilar (Burgos, 2004). Además el 52.5% de las muestras en estudio fueron tratadas para baciloscopia concentrada (Tabla 04), lo cual mejora altamente la calidad de la muestra, especialmente aquellas muestras diferentes a esputo que por lo general presentan baja carga bacilar. Al comparar el grado de positividad de las dos pruebas en estudio: Löwenstein-Jensen modificado y convencional, con respecto a la prueba baciloscópica realizada antes del cultivo, se observó una relación directa entre el grado de positividad (carga bacilar) de la baciloscopia y el cultivo en medio Löwenstein-Jensen modificado (Tabla 04 y Figura 02).

Se considera que una posible causa de la baja sensibilidad puede atribuírsele a la concentración de Nitrato de potasio usada en el medio de cultivo que fue de 35%, por lo que sería recomendable continuar con otros estudios para evaluar concentraciones menores a 35% y correlacionarlas con la sensibilidad. Al respecto, recientemente en Cuba se vienen evaluando concentraciones crecientes de KNO_3 a partir de 1 mg/ml (Lemus, 2005; comunicación personal). También en el Laboratorio de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud en Lima, Perú, se viene ensayando el uso del Nitrato de sodio como aditivo a concentraciones menores a 35% para estudios de sensibilidad a drogas de primera línea (Asencios, 2005; comunicación personal).

Se ha demostrado en el presente estudio que la adición de Nitrato de potasio, al medio de cultivo no es un inhibidor del crecimiento de *M. tuberculosis* porque se obtuvo un 100% de crecimiento en las 93 muestras positivas evaluadas (Tabla 05), como lo señalan también los estudios realizados para pruebas de susceptibilidad a drogas de primera línea en los que se comparó el método

tradicional para sensibilidad a drogas antituberculosas, es decir, “El método de proporciones” (Caneti *et al.*, 1969), autorizado por la organización mundial de la salud (OMS), con el método “nitrato reductasa assay”(NRA) en el que se hace la prueba de la nitratoasa, obteniéndose en este último un crecimiento de 99-100%, presentando alta concordancia con el método convencional (Panaiotov *et al.*, 2002). Similar resultado se obtuvo al comparar el método de la NRA con el método semiautomatizado BACTEC 460, donde se apreció un crecimiento del 100% (Sethi *et al.*, 2004).

El “Department of Health and Human Services”, Atlanta, señala que la posibilidad de que *M. tuberculosis* sea negativo en una prueba de reducción de nitratos es menor al 1% (Kent *et al.*, 1985). En el presente estudio se obtuvo un 0%, de acuerdo a las pruebas de tipificación realizadas, lo que ubica el método en el rango esperado.

Es necesario considerar que para cepas diferentes a *M. tuberculosis* el empleo de esta técnica no sería muy útil (Tabla 10), debido a que la base de este método es la capacidad de reducir Nitratos a Nitritos, además los casos de tuberculosis extrapulmonar, serían una de las principales limitaciones, ya que se trata de muestras paucibacilares (de escasa carga bacilar), lo cual demandaría un mayor tratamiento en el procesamiento de las muestras, por esta razón en el presente estudio se consideraron muestras provenientes del tronco pulmonar con tuberculosis presuntiva, con baciloscopía directa y concentrada, de pacientes con diagnóstico radiológico o sintomático de tuberculosis pulmonar (Guevara *et al.*, 2003).

En la actualidad están disponibles varios métodos para diagnóstico de tuberculosis, pero requieren mucho tiempo, como el método convencional de cultivo Löwenstein-Jensen o métodos rápidos pero costosos como por ejemplo el método BACTEC-460 (Montoto, 2001), el cual se viene utilizando aún en nuestro

país a pesar de los residuos radioactivos que libera, por lo que en otros países ya no se está empleando. En países desarrollados se están utilizando métodos moleculares y genéticos, además de otros métodos ya descritos (Burgos, 2004; Guevara *et al.*, 2003) que están presentes en el mercado, pero no son accesibles desde el punto de vista del costo a la mayor parte de la población peruana que padece de esta enfermedad por ser principalmente una población de bajos recursos económicos, lo mismo ocurre en otros países en vías de desarrollo. El empleo de la prueba de la nitrato reductasa se presenta como una interesante alternativa para el diagnóstico de la tuberculosis en países en desarrollo como el nuestro, ya que solo se agrega un aditivo al medio de cultivo convencional, el Nitrato de potasio, que es de bajo costo, y se sigue utilizando la misma infraestructura y equipos (Figuras 10, 11, 12), por lo que no se requiere de gastos adicionales al método convencional (Tabla 17). Los resultados obtenidos demuestran que la Prueba de la Nitrato Reductasa en el medio de cultivo Löwenstein-Jensen modificado es una alternativa para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar.

VI. CONCLUSIONES

1. La producción de nitritos en el medio de cultivo Löwenstein-Jensen modificado mostró un 100% de especificidad, excluyendo la posibilidad de resultados falsos- positivos.

2. La producción de nitritos en el medio de cultivo Löwenstein-Jensen modificado mostró una sensibilidad del 41% respecto al medio convencional que tuvo 85%.
3. El cultivo en Löwenstein-Jensen modificado permite diagnosticar en menor tiempo que el cultivo en Löwenstein-Jensen convencional debido a que detecta la presencia de *M. tuberculosis* antes de la aparición de colonias en el medio convirtiéndose en una importante alternativa para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar.
4. El Nitrato de potasio, como aditivo en el medio de cultivo, no tiene acción inhibitoria sobre el crecimiento de las micobacterias.
5. La técnica modificada reduce sustancialmente los costos y facilita el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar.

VII. RECOMENDACIONES

- La técnica no debe emplearse para la detección de micobacterias atípicas (que no tengan capacidad para reducir nitratos a nitritos).

- Se deba continuar con los estudios de esta índole ensayando con concentraciones menores de Nitrato de potasio en el medio de cultivo, a fin de comparar los resultados obtenidos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÄNGEBY K. A. KRISTIAN, KLINTZ LISBETH, & SVEN E. HOFFNER. 2002. Rapid and Inexpensive Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a Nitrate Reductase Assay. Department of Bacteriology, Swedish Institute for

Infectious Disease Control, Solna, and Division of International Health, Karolinska Institute. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Feb., pp. 553-555
Vol. 40, N°.2. 10.

ASENCIOS L. S. 2005. (Comunicación personal). Jefe del Laboratorio de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud (INS). Lima - Perú.

BURGOS M. 2004. Informe de la 1era Reunión Regional de la Red de Laboratorios de Tuberculosis, Universidad de Nuevo México (UNM), EUA), México, DF.

CANETTI G, FOX W, KHOMENKO A, MAHLER HT, MENON NK, & MITCHISON DA. 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programme. Bull World Health Organ; 41: 21-3.

DÍAZ F.J. Enero 2005. Diagnóstico Microbiológico de la Tuberculosis, Patol Clínica Hoy; Vol N° 1, MODULO 3: p: 35-38.

FARGA V. 1995. Tuberculosis. 2da Edición. Santiago de Chile. Editorial Mediterráneo; pp.: 43.

GONZÁLEZ S.A COLOMBO, & SCHOIJET V.E. 2003 Metodología diagnóstica para la detección de la tuberculosis. Servicio de Clínica Médica del Hospital J. R. Vidal y Consultorio Externo de Infectología; Revista Médica del Nordeste - N° 4; pp.:8-15.

GUEVARA GUZMÁN A, JUÁREZ HERNÁNDEZ ANÍBAL, & ZENTENO CUEVAS R. 2003. Tuberculosis y la importancia metodologías de diagnóstico. Laboratorio de

Ecología y Salud, Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México. No. 3, Ap. Postal 91000, Xalapa, México.

INSTITUTO PANAMERICANO DE PROTECCIÓN DE ALIMENTOS Y ZOONOSIS. 1986. Manual de normas y procedimientos técnicos en bacteriología de la tuberculosis. (Ed.) Martínez, Pcia de Bs. As. Nota técnica N°28.

KENT, P. T, & G. P. KUBICA. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Ga.pp.96-103.

LEMUS D. 2005. (Comunicación personal). Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Micobacteria, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, Habana, Cuba.

LÓPEZ G. DE ULLIBARRI I, & PÍTA S. FERNÁNDEZ. 2003 .Curvas ROC Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. A Coruña (España).

Manual de Normas de Bioseguridad para los Laboratorios de Diagnóstico de la tuberculosis serie de normas técnicas N°8 Lima, marzo- 2005.

MEJÍA G.I, GUZMÁN A.M., AGUDELO C.A., TRUJILLO H, & ROBLEDO J. 2004. Biomédica; 24 (Sup.): 52-9.

MOLE R.J & MASKELL T.W. 2001. Phage as diagnostic-the use of phage in TB diagnosis. J Chem Technol Biotechnol; pp.76.

MONTOTO M.A. 2001. TUBERCULOSIS – ENFERMEDAD EMERGENTE COMO DIAGNOSTICARLA Sección Bacteriología. Laboratorio del Hospital Alemán. Laboratorio de Bacteriología de TBC. Programa de Control de TBC. Hospital E. Tornú. G.C.B.A; pp.101.

MONTOSO E, LEMUS D, ECHEMENDIA M, MARTIN A, PORTAELS F & PALOMINO J.C. 2000. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en Tuberculosis y Mycobacteria, Instituto de Medicina Tropical 'Pedro Kouri', Habana, Cuba; pp.155.

MUSA HUMBERTO R, AMBROGGI M, SOUTO A, & ÄNGEBY. K.A KRISTIAN. 2005. Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a Nitrate Reductase Assay Applied Directly on Microscopy-Positive Sputum Samples. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, pp.:3159–3161.

PANAIOTOV S, & KANTARDJIEV T. 2002. Nitrate reductase assay for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol; 40:3881-2.

PRAT A.C, DOMÍNGUEZ B.J & AUXINA R.V. 2000. Utilidad del cultivo en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar. *Mycobacterium bovis*. Servicio de microbiología. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona Revista Salud Pública y Nutrición Vol.1, No3.

Resumen de actividades del Comité de Tuberculosis de la Región Metropolitana en el año 2001. Abril 2002 Rev. chil. ENFERMEDADES RESPIRATORIA. V.18 n.2 Santiago-Chile.

ROSINO A, TORRABA L, MARTÍNEZ DE ARTOLA V, & GUTIÉRREZ M. 1998. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas realizada con dos técnicas de amplificación: Gen-Probe y PCR (Amplicor) ANALES Sis San Navarra, 21 (Supl. 3): 113-117.

SACKETT DL, HAYNES RB, GUYATT GH, & TUGWELL P.1994. Epidemiología clínica. Ciencia básica para la medicina clínica. 2ª ed. Madrid: Editorial médica panamericana.

SETHI S, SHARMA S, SHARMA S.K, MEHARWAL S.K, JINDAL S.K & SHARMA M. 2004. Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to primary antitubercular drugs by nitrate reductase assay Indian J Med Res 120; pp. 468-471.

SLOUTSKY A. 2001. Informe de la Iera Reunión Regional de la Red de Laboratorios de Tuberculosis, Laboratorio Estatal de Massachusetts, Boston.

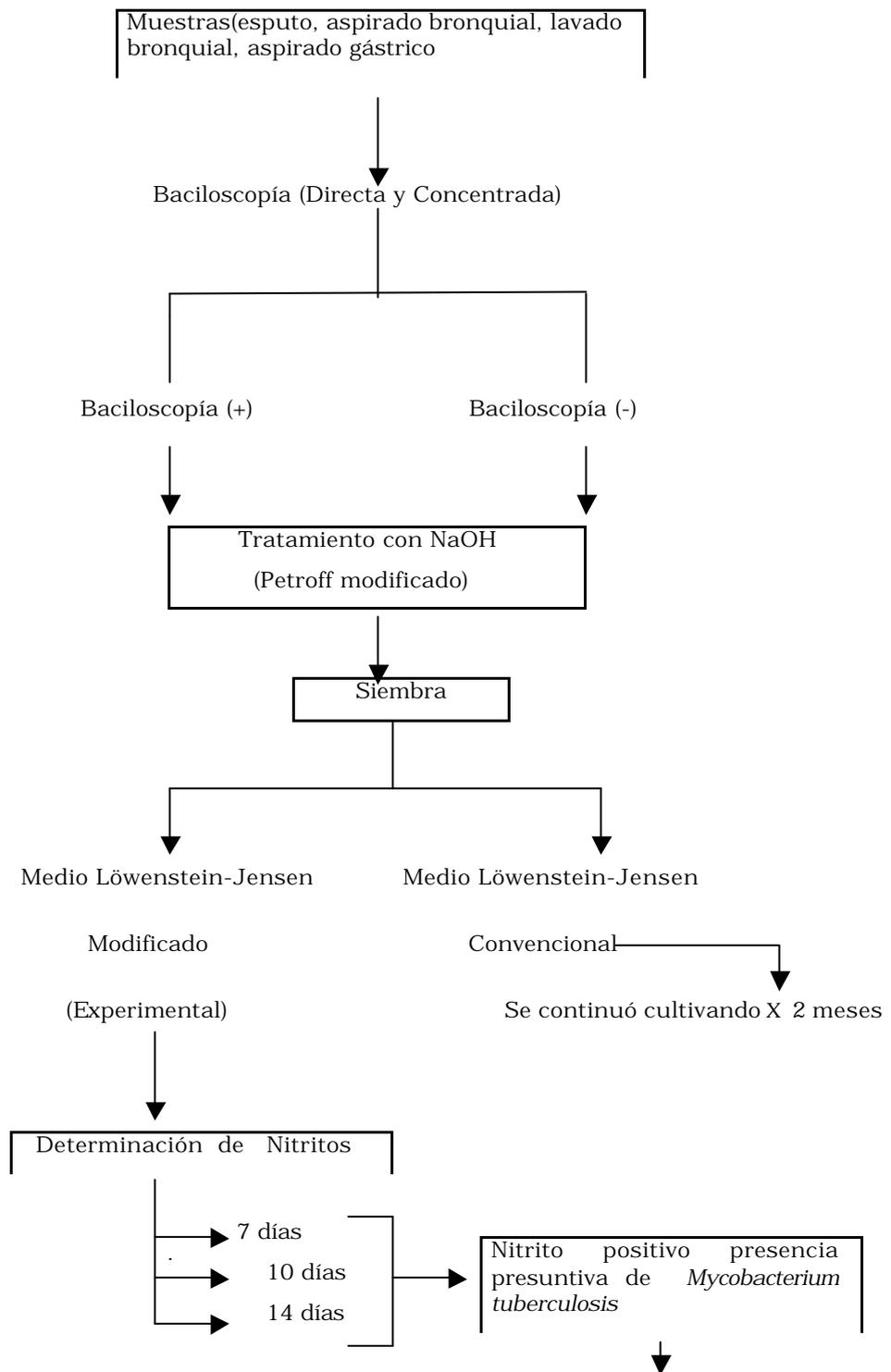
Técnica de Petroff Modificado.1998. Laboratorio de control de la, HOMS; pp. 24.

TORTOLI E, BENEDETTI M, FONTANELLI A, & M. TULLIA SIMONETTI. 2002. Evaluation of Automated BACTEC MGIT 960 System for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Four Major Antituberculosis Drugs: Comparison with the Radiometric BACTEC 460TB Method and the Agar Plate Method of Proportion. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, pp. 607-610 Vol. 40, No. 2.

VIADER J. MA, GUERRERO M, & DEL. CARMEN A. M. 2003. Evaluación de una prueba de detección de Micobacterias directamente de muestras de esputo y de cultivos jóvenes. Edición No.1.

IX. TABLAS Y FIGURAS

TABLA 01. Organigrama de trabajo para evaluar la Prueba de la Nitrato Reductasa en medio de cultivo Löwenstein-Jensen modificado para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*



Pruebas confirmativas

*En todos los casos se realizaron controles

Niacina y Catalasa

TABLA 02. Tipo de muestras analizadas para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidas de pacientes del laboratorio de tuberculosis del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)

Tipo de muestras	Nº de muestras	%
Espuito	105	87.50
Aspirado Bronquial	10*	8.33
Aspirado Gástrico	4*	3.33
Lavado Bronquial	1*	0.84
Total	120	100

* Se obtuvieron de pacientes menores de 15 años y de pacientes VIH positivos.

TABLA 03. Clasificación de las muestras de esputo obtenidas de pacientes del laboratorio de tuberculosis del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)

Espuitos	Nº de muestras	%
Con saliva	20	19.05
Mucoide	31	29.52
Hemóptico	6	5.71
Mucopurulento	48	45.71
Total	105	100

TABLA 04. Baciloscopia de las muestras obtenidas de pacientes del laboratorio de tuberculosis del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)

Tipos de baciloscopia	Número de muestras			
	Total	%	B(+)*	B(-)*
Baciloscopia Directa	57	47.50	43	14
Baciloscopia Concentrada	63	52.50	50	13
Total	120	100	93	27

* B (+): baciloscopia positiva
 * B (-): baciloscopia negativa

TABLA 05. Producción de nitritos en las muestras cultivadas en el medio Löwenstein-Jensen modificado obtenidas de pacientes del laboratorio de tuberculosis del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005). Comparación con el medio Löwenstein-Jensen convencional.

Producción de Nitritos	P2		P3	
	Nº	%	Nº	%
1+	19	15.80	11	9.10
2 +	11	9.10	60	50
3 + o superior	8	6.60	22	18.30
Negativo (-)	82	68.30	27	22.50
Total	120	100	120	100

P2: Prueba Löwenstein-Jensen modificado
 P3: Prueba Löwenstein-Jensen convencional

La producción de nitritos a la presencia de la enzima nitrato reductasa presente en *Mycobacterium tuberculosis*.

TABLA 06. Sensibilidad y especificidad de la Prueba de la nitrato reductasa (Löwenstein-Jensen modificado) comparada con la prueba de cultivo convencional para *Mycobacterium tuberculosis*, obtenidas de pacientes del laboratorio de tuberculosis del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)

	S (%)	E (%)	C (%)	Tiempo de C (promedio)
Prueba de la Nitrato Reductasa (L-J modificado)	41	100	100	12días
(L-J convencional)	85	98	100	45días

C: Crecimiento
E: Especificidad
S: Sensibilidad
L-J: Löwenstein-Jensen

TABLA 07. Estudio de validez predictiva de Prueba de la nitrato reductasa (Löwenstein-Jensen modificada), obtenido de pacientes del laboratorio de tuberculosis del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)

	Prevalencia %	VPP %	VPN %
Prueba de la Nitrato Reductasa (L-J modificado)	77.50	100	34

VPP: valor predictivo positivo
VPN: valor predictivo negativo
NRA: Prueba de la nitrato reductasa
L-J: Löwenstein-Jensen

TABLA 08. Calculo de los tiempos esperados (tiempo promedio) de la Prueba de la nitrato reductasa en medio Löwenstein-Jensen modificado comparada el Löwenstein-Jensen convencional. Obtenidos de pacientes del laboratorio de tuberculosis del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)

Períodos de lectura (días)	Producción de Nitritos (Nº de muestras positivas acumuladas)	
	L-J	L-J
	modificado	convencional
7	6	0
10	24	0
14	38	0
30	/	86
60	/	92
Tiempo Promedio	12 días	45 días

L-J: Löwenstein-Jensen
/: No se evaluó

0: No se detectó presencia de Nitritos

TABLA 09. Calculo del tiempo de positividad de la Prueba de la nitrato reductasa (Löwenstein-Jensen modificado) evaluados a los 7,10 y 14 días de ser cultivadas. Obtenido de pacientes del laboratorio de tuberculosis del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)

Positividad	Lectura de los tubos Löwenstein-Jensen modificado					
	7 días		10 días		14 días	
	%	%	%	%	%	%
P (+)	6	15.80	10	26.30	9	23.60
P (++)	0	0	7	19.40	3	7.80
P (3+a 5+)	0	0	1	3.80	2	7.60
Total	6	15.80	18	47.40	14	36.80

P: positivo

P (+): viraje de color a rosa pálido

P (++) : viraje de color a rojo

P (+++) : viraje de color a rojo grosella

TABLA 10. Comparación de las pruebas Löwenstein-Jensen convencional y modificada, mediante el TEOREMA DE BAYES, obtenidas de pacientes del laboratorio de tuberculosis del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)

	p (P2 positivo)	%	p (P2 negativo)	%
Prueba L-J				
Modificado	0.30	29.50	0.74	74
Prueba L-J				
Convencional	0.50	50	0.50	50

P(P2 | positivo): probabilidad de que un paciente escogido al azar de positivo y haya sido detectado por la prueba Löwenstein-Jensen modificada.

p (P2 | negativo): probabilidad de que un paciente escogido al azar de positivo y haya sido detectado por la prueba Löwenstein-Jensen modificada.

El Teorema de Bayes permite calcular la probabilidad de que un paciente escogido al azar sea detectado por la Prueba de la Nitrato Reductasa en el medio Löwenstein-Jensen modificado.

TABLA 11. Identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium chelonae* a partir de Löwenstein-Jensen modificada y Löwenstein-Jensen convencional, obtenido de pacientes del laboratorio de tuberculosis del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)

Sps. Identificadas	Nº de muestras	%
<i>M. tuberculosis</i>	92	98.90
<i>M. chelonae</i>	1.00	1.10

TABLA 12. Clasificación Modificada de Runyon de las micobacterias más frecuentes aisladas en muestras clínicas según; Manual de Normas de Bioseguridad para los Laboratorios de Diagnóstico de la tuberculosis, serie de normas técnicas N°8 Lima, marzo- 2005

Micobacterias de crecimiento lento			Micobacterias No Tuberculosas de Crecimiento rápido
Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Fotocromógenas	Escotocromógenas	No Cromógenas	
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. abscessus</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. chelonae</i>
<i>M. marinum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. simiae</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. mucogenicum</i>
	<i>M. xenopi</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. peregrinum</i>
		<i>M. haemophilum</i>	<i>M. porcinum</i>
		<i>M. intracellulare</i>	
		<i>M. malmoense</i>	
		<i>M. nonchromogenicum</i>	
		<i>M. shimoidei</i>	
		<i>M. térrea</i>	
		<i>M. triviales</i>	
		<i>M. tuberculosis</i>	
		<i>M. ulcerans</i>	

TABLA 14. Características Bioquímicas de la micobacterias típicas.

Prueba	<i>M. tuberculosis</i>	BCG.	<i>M. bovis</i>
Crecimiento	L	L	L
Temperatura 22-25°C	-	-	-
32-33°C	+	+	+
35-38°C	+	+	+
41-43°C	-	-	-
Medio Löwenstein- Jensen	+	+	(-) o disgónico
Niacina	+	Débilmente +	-
Catalasa 68°C	-	-	-
Nitrato reducción	+	Débilmente +	-
Hidrólisis -Tween	Variable	-	-
Pigmentación Oscuridad	-	-	-
Fotocromogenicidad	-	-	-

TABLA 15. Comparación de la sensibilidad obtenida por el método de proporciones y la prueba de reducción de nitratos (NRA).

Drogas Crecimiento Anti- uberculosas	Susceptibilidad por método de proporciones	Resistencia por método NRA	(%)
Isoniazida	0	1	99
Rifampicina	0	0	100
Etambutol	0	1	99
Estreptomycin	0	0	100

NRA: Nitrate reductase assay

TABLA 16. Comparación de la sensibilidad obtenida por el método BACTEC 460 TM y el método de reducción de nitratos (NRA) para pruebas de susceptibilidad a drogas de primera línea.

Resultados NRA					
Droga	Bactec 460	Nº de cepas Resistentes	Nº de cepas susceptibles	S(%)	E(%)
RIF	Resistente	31	0	100	100
	Susceptible	0	26		
INH	Resistente	32	1	97	96
	Susceptible	1	23		
STR	Resistente	21	1	95	83
	Susceptible	6	29		
EMB	Resistente	9	3	75	98
	Susceptible	1	44		
Total	Resistente	93	5	95	94
	Susceptible	8	122		

TABLA 17. Presupuesto otorgado por el Ministerio de salud (MINSA) para el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis para el año 2005.

PROCESOS	MONTO(soles)
Baciloscopia	600.800,23
Cultivo	429.584,10
PPD	475.486,00
TRATAMIENTO ESQUEMA : VIH, SIDA, TB	83.835,24
TRATAMIENTO ESQUEMA I Niño	3.313.140,70
TRATAMIENTO ESQUEMA I Adulto	226.003,08
TRATAMIENTO ESQUEMA II	2.093.589,76
TRATAMIENTO ESQUEMA III	249.326,91
TRATAMIENTO ESQUEMA TB-MDR	4.159.338,15
TRATAMIENTO QUIMIOPROFILAXIS/VIH	46.469,00
TOTAL PARCIAL	12.877.573,16
TRATAMIENTO INDIVIDUALIZADO	3.323.200,00
TOTAL GENERAL	16.200.773,17

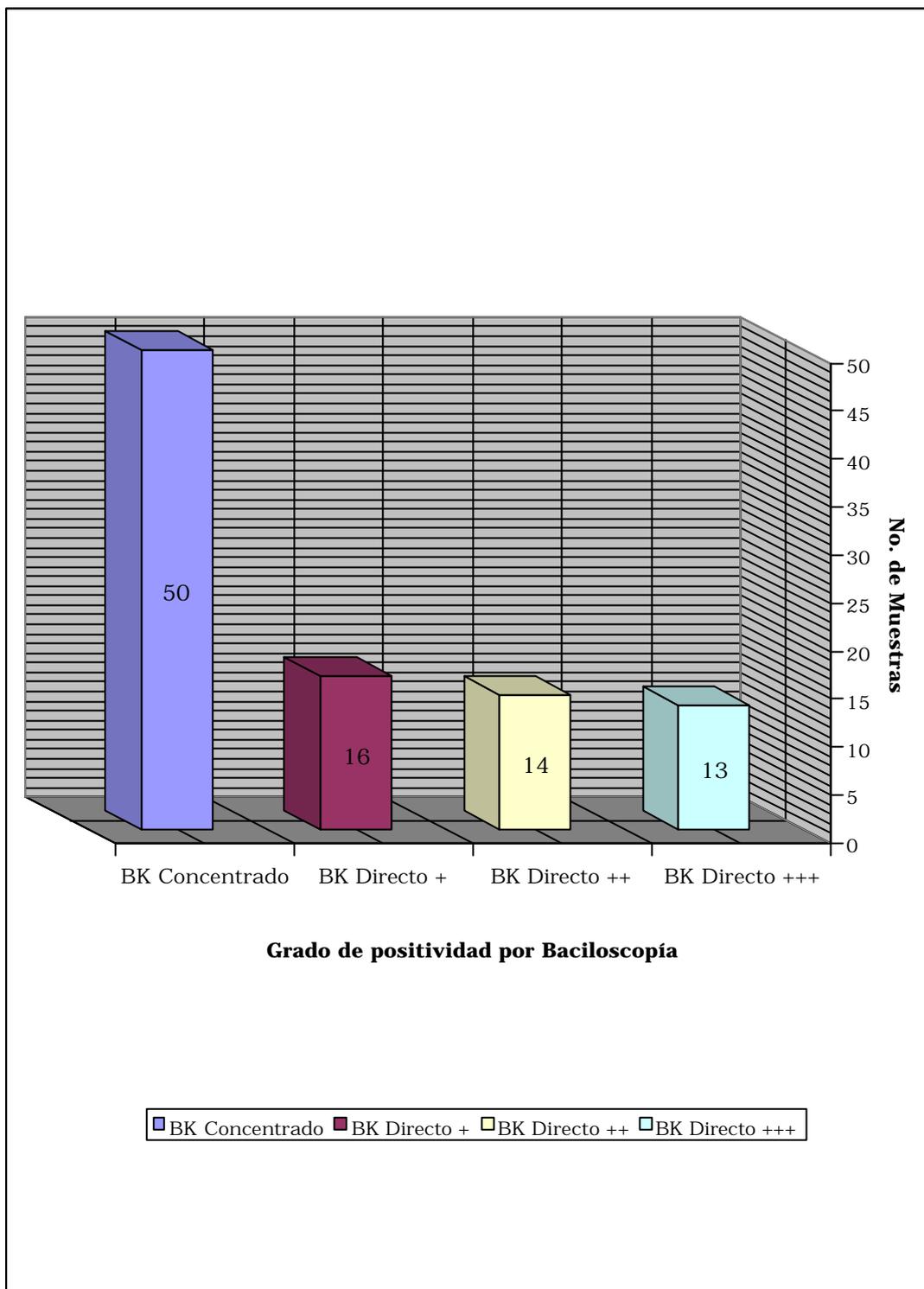


FIGURA 01. Muestras positivas a la baciloscopia directa y concentrada. BK D, baciloscopia directa; BK C, baciloscopia concentrada. El grado de positividad expresa en número de cruces.

Fuente: Laboratorio Central de tuberculosis, Departamento de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)

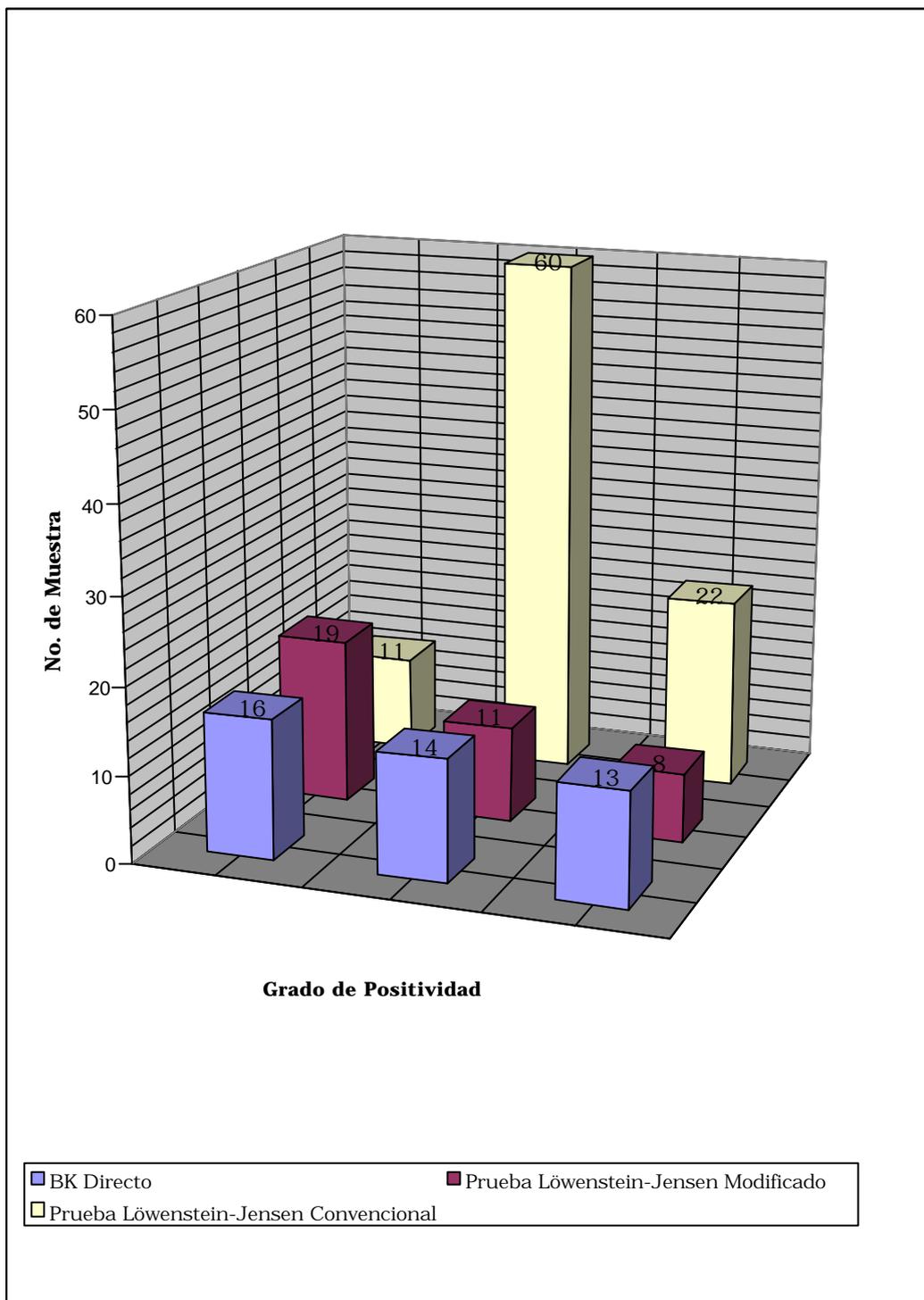


FIGURA 02. Comparación de la positividad de los cultivos; Löwenstein-Jensen modificado o Prueba de la nitrato reductasa (P2) y Löwenstein-Jensen convencional (P3) y la baciloscopia directa (BK D).

Fuente: Laboratorio Central de tuberculosis, Departamento de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)

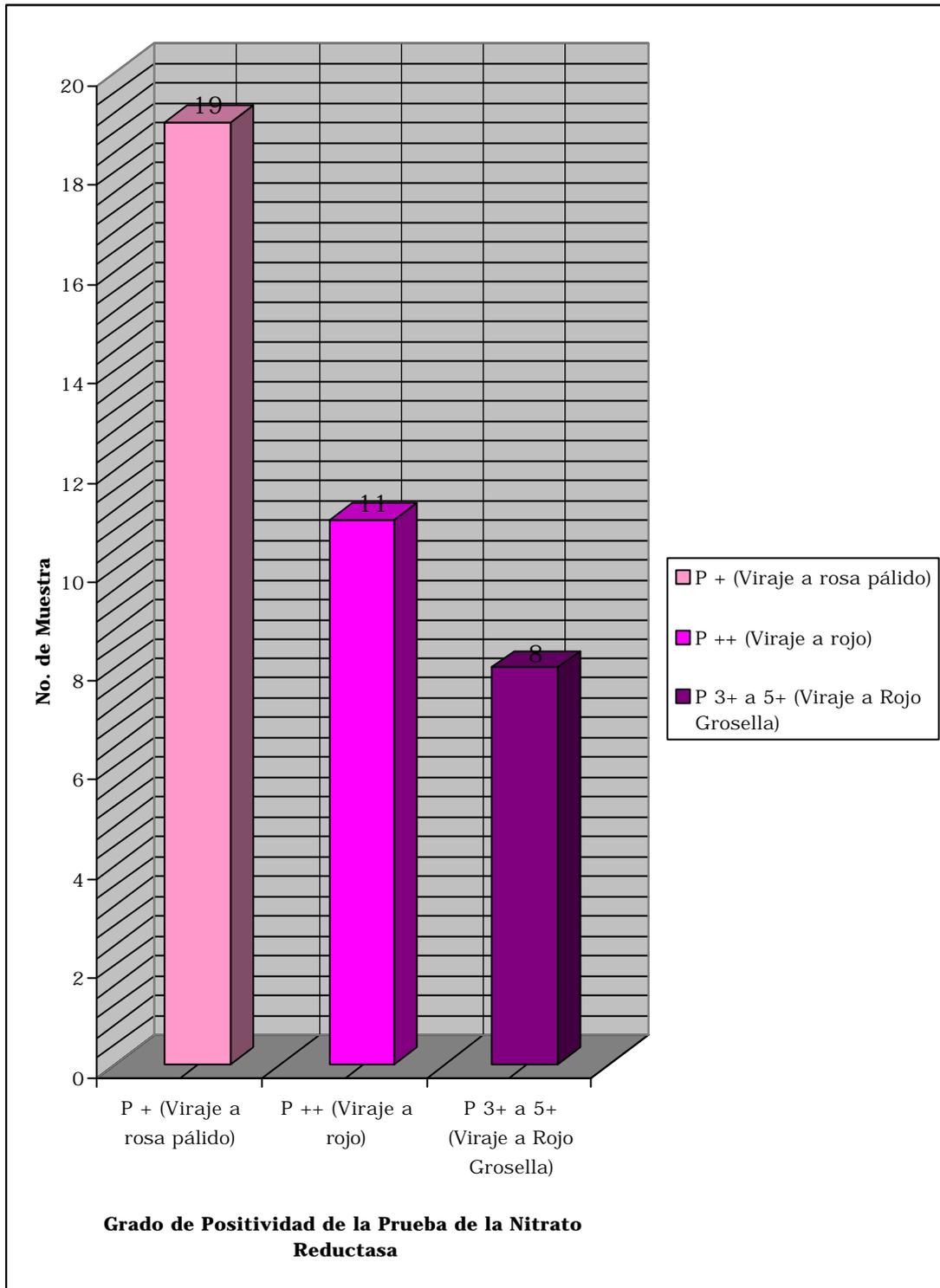


FIGURA 03. Positividad de las muestras cultivadas en Löwenstein-Jensen modificada, los resultados fueron en su mayoría de 1+ (**P+**), seguido de 2+ (**P++**), y en menor proporción de 3+ (**P3+ a 5+**).

Fuente: Laboratorio Central de tuberculosis, Departamento de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)

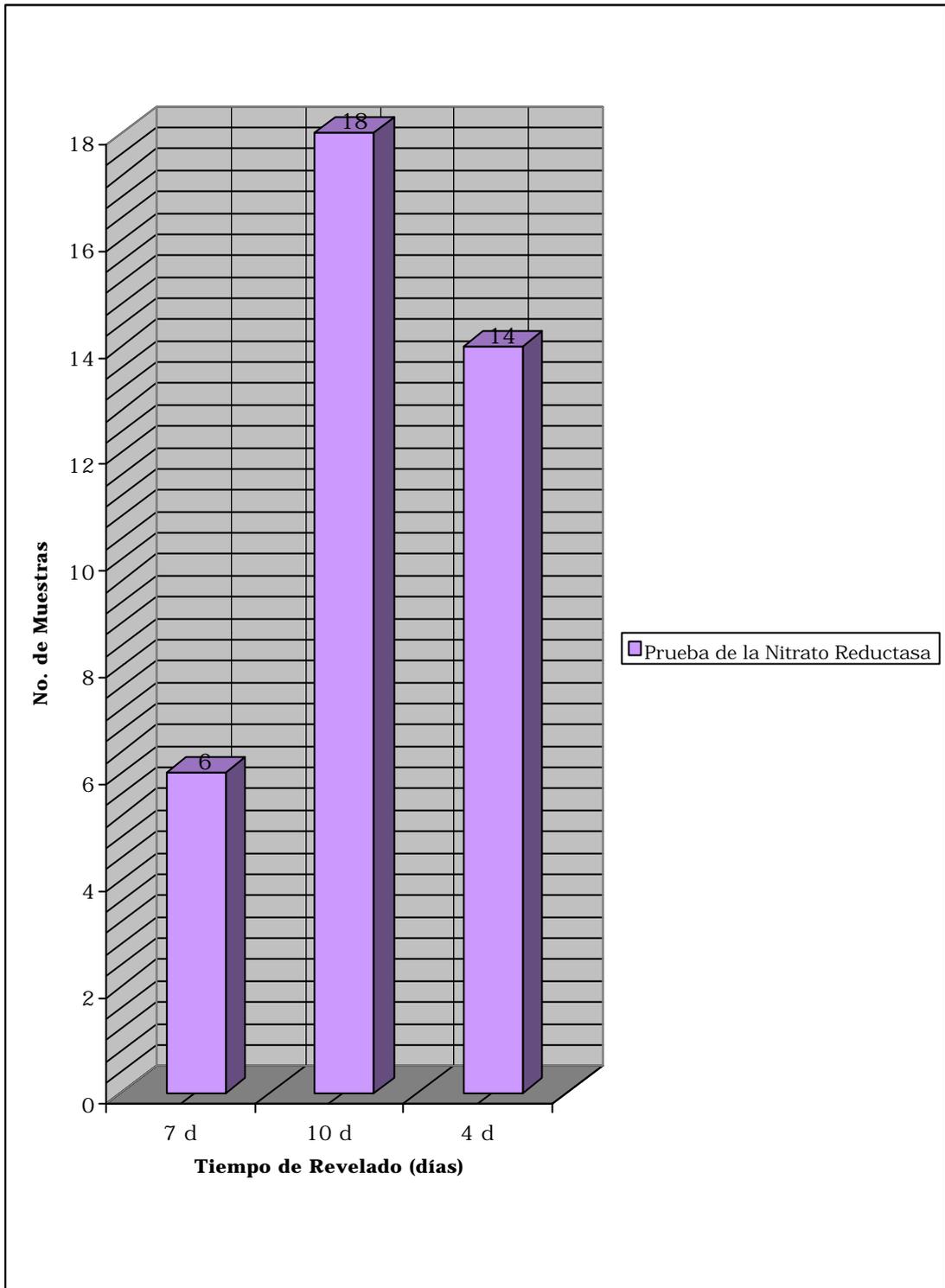


FIGURA 04. Positividad de la prueba Nitrato Reductasa en medio Löwenstein-Jensen modificado Oexpresado en días. Evaluados a los 7,10 y 14 días, se observa crecimiento cualitativo con viraje de color en su mayoría a los 10 días de la siembra.

Fuente: Laboratorio Central de tuberculosis, Departamento de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)

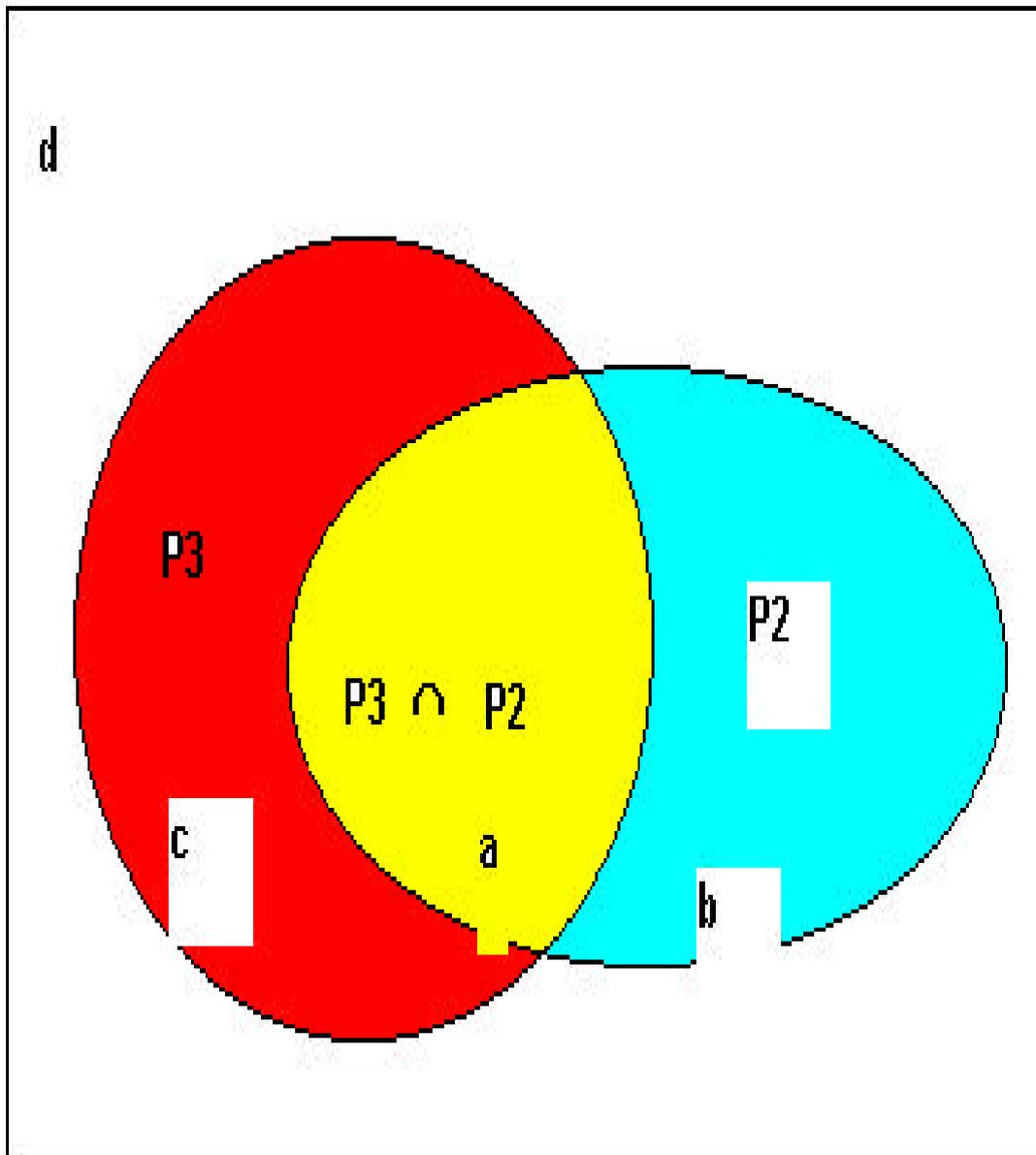


FIGURA 05. Diagrama de VENN Para visualizar los conjuntos de enfermos verdaderos y falsos según las pruebas.

Fuente: Laboratorio Central de tuberculosis, Departamento de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)

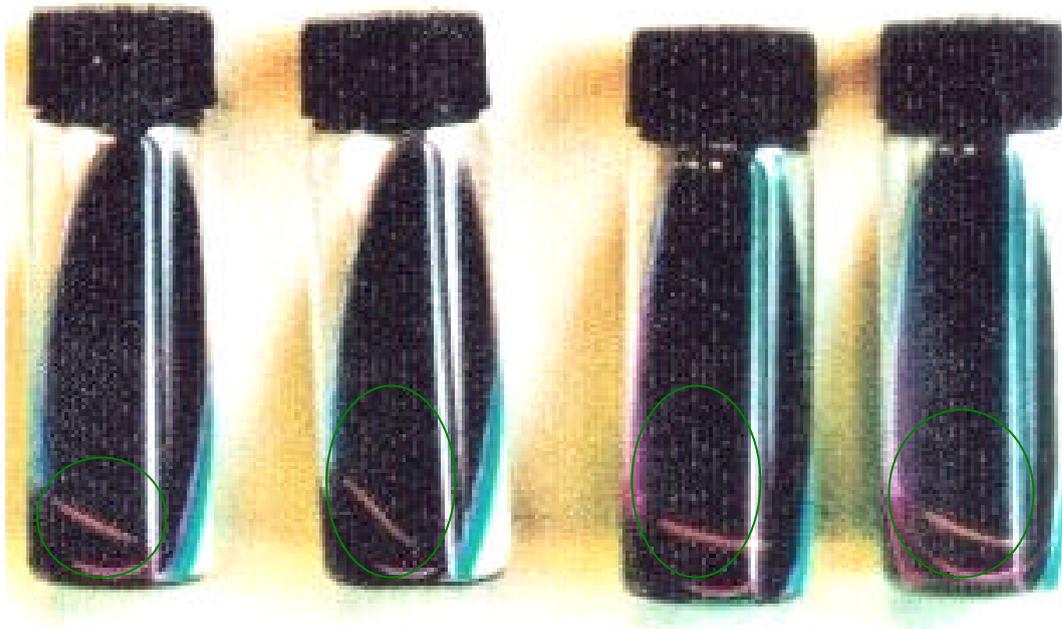


FIGURA 06. Revelado de muestras a los 10 días, luego de la siembra en medio de cultivo Löwenstein-Jensen modificado (Prueba de la nitrato reductasa). Viraje de color del medio como señalan los círculos, indica crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*.

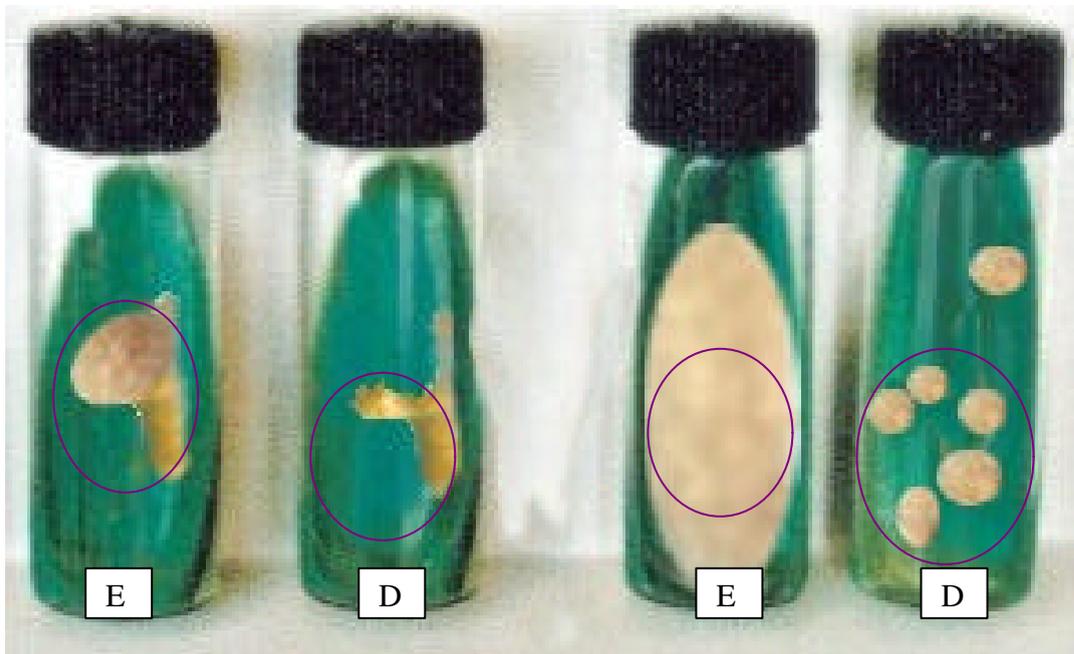


FIGURA 07. Crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en medio Löwenstein-Jensen convencionales observó desarrollo de colonias, disgónicas (D) colonias pequeñas < 1mm de diámetro y eugónicas (E) crecimiento profuso, como se aprecia en los círculos.

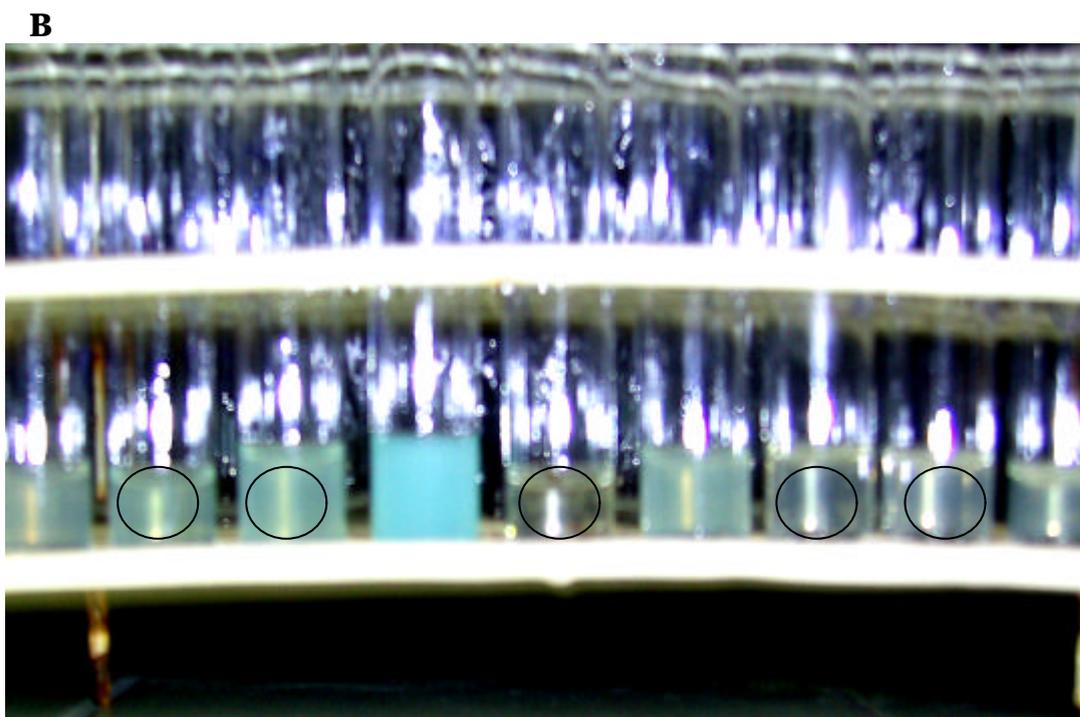


FIGURA 08. Pruebas de tipificación de *Mycobacterium tuberculosis*, (A) catalasa positiva a temperatura ambiente con desprendimiento de oxígeno y agua (producción de burbujas). (B) Niacina positiva, viraje de color a amarillo. La reacción positiva se observa en los círculos.

Fuente: Laboratorio Central de tuberculosis, Departamento de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)

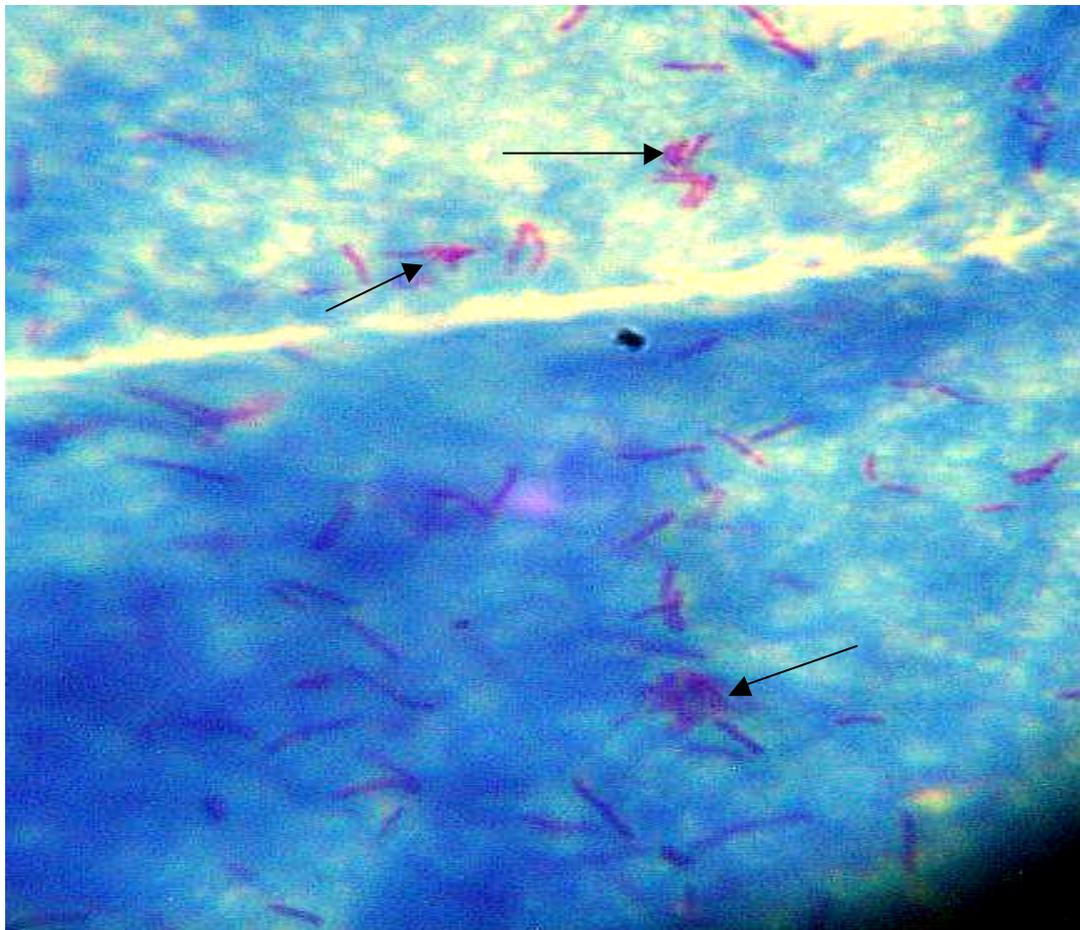


Figura 09. Lectura de baciloscopías. Con dos cruces de positividad (P++) leído en 50 campos microscópicos a 100X. La formación de cordones de bacilos señalados con las flechas.

Fuente: Laboratorio Central de tuberculosis, Departamento de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara I. (2005)



FIGURA 10. Cabina de seguridad de flujo laminar. Para procesamiento de las muestras para diagnóstico de tuberculosis.



FIGURA 11. Coagulador para los medios de cultivo. Para la preparación de los medios Löwenstein-Jensen, los tubos fueron colocados en plano inclinado a temperatura de 84 °C por 45 minutos.



FIGURA 12. Centrífuga a prueba de aerosoles. Donde se concentraban las muestras a 3000 RPM por 15 minutos; antes de ser sembrados en los medios de cultivo Löwenstein-Jensen convencional y modificado.

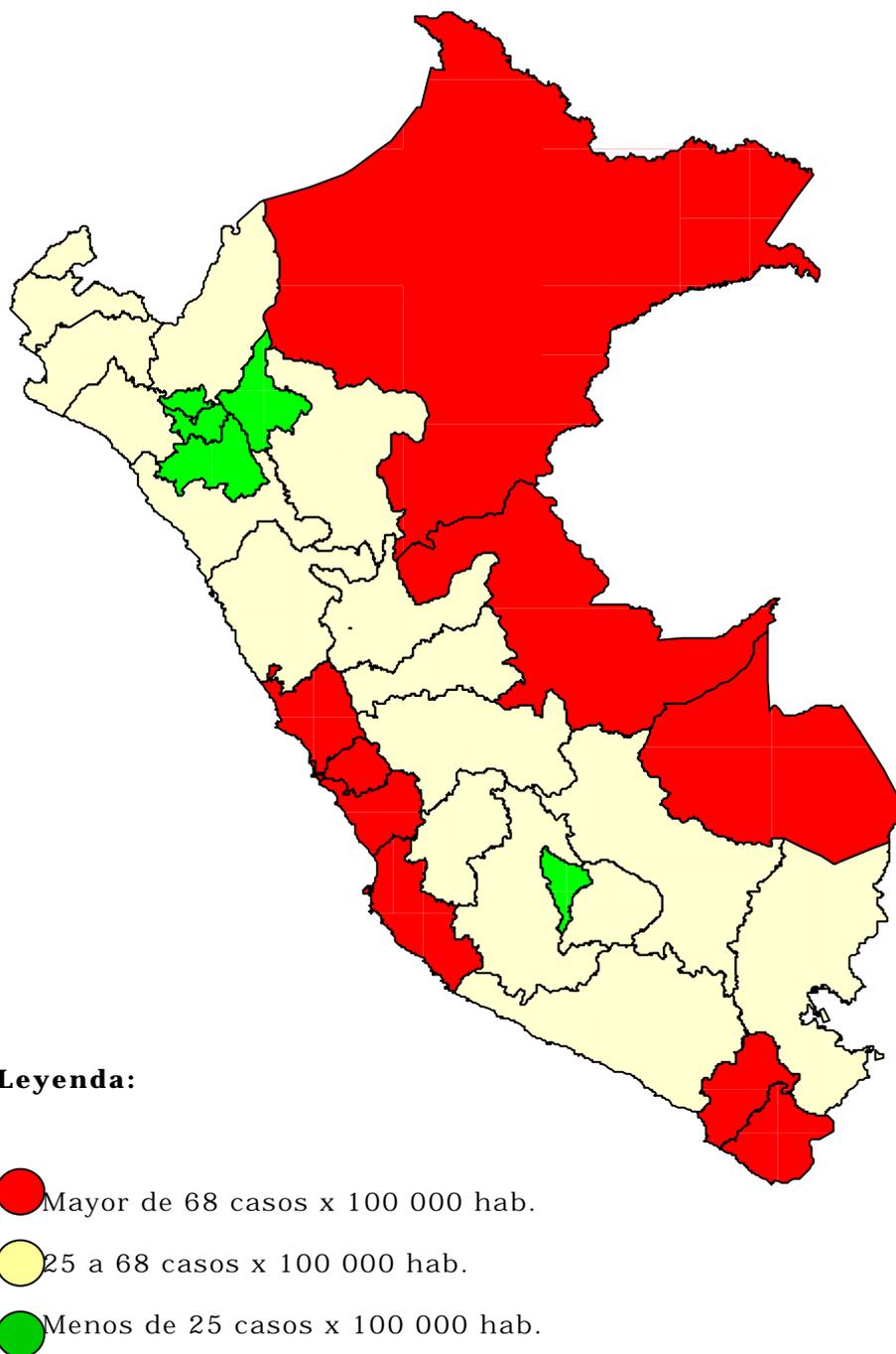
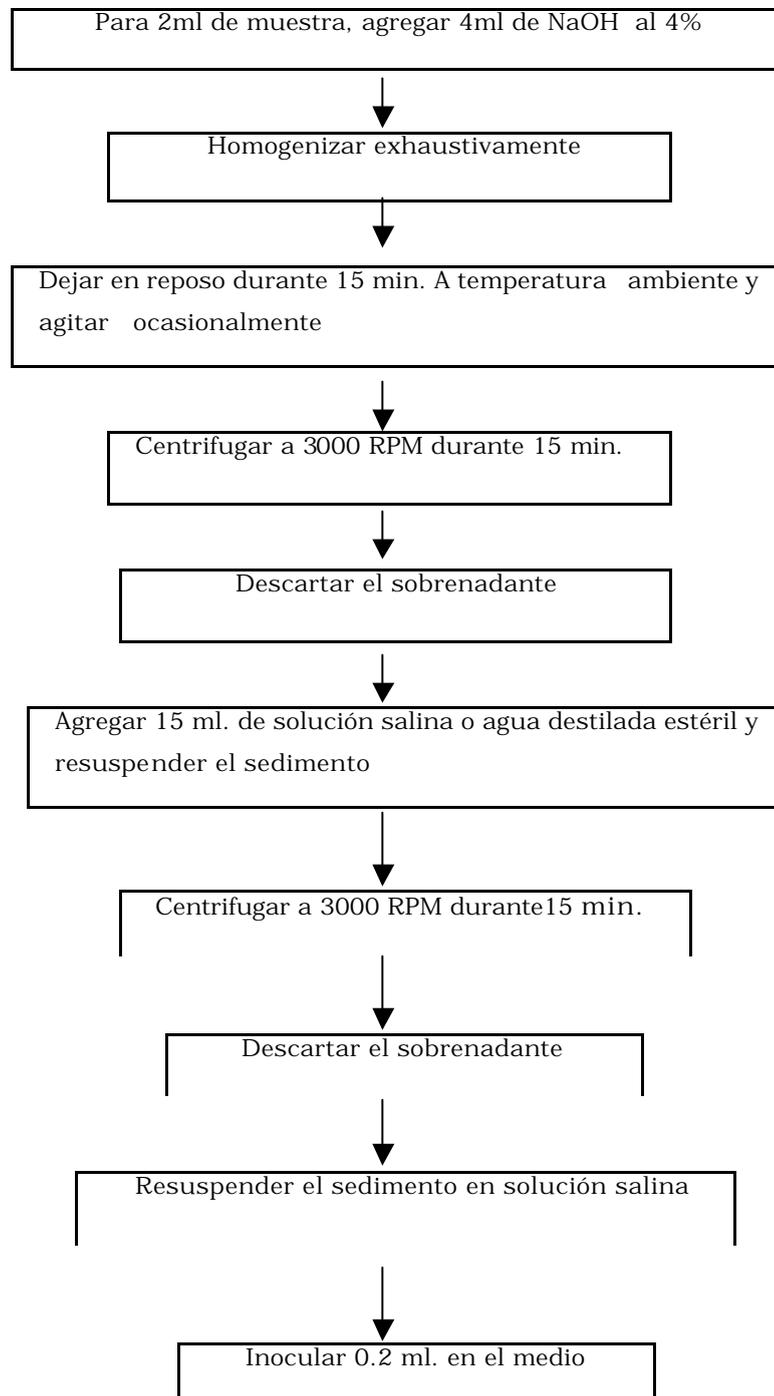


FIGURA 13. Incidencia de la tuberculosis BK (+), Perú 2000-2005.

Fuente: DGSP-Informes operacionales de la ESNP y CTB.

X.-ANEXOS

ANEXO 01. Flujograma del Método Petroff modificado o Método del hidróxido de sodio para el tratamiento de descontaminación y homogeneización de las muestras.



ANEXO 02. Composición de los medios de cultivo empleados: Medio L-J convencional, Medio L-J modificada.

Composición de los medios de cultivo

Medio L-J convencional	Medio L-J modificada
Fosfato Monopotásico (KH ₂ PO ₄)	Fosfato Monopotásico (KH ₂ PO ₄)
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ +7H ₂ O)	Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ +7H ₂ O)
Citrato de Magnesio	Citrato de Magnesio
L - Asparagina	L - Asparagina
Agua destilada	Agua destilada
Huevo homogenizado	Huevo homogenizado
Glicerina Bidestilada	Glicerina Bidestilada
Verde de Malaquita	Verde de Malaquita
	Nitrato de potasio (NO ₃ K al 35%)

Medio L-J: Medio Löwenstein-Jensen

ANEXO 03. Composición de los principales reactivos, empleados en el presente estudio.

Nitrato de Potasio
NO₃K al 35%)
Agua destilada estéril
Suero fisiológico
NaOH al 4%
H₂ SO₄ al 8%
BK-tween 80 al 10%
Peróxido de hidrógeno
Na₂ HPO₄ 15M
KH₂PO₄ 15M

Reactivo de Peter Griess:

Solución A: Ácido clorhídrico concentrado diluido en agua 1:1.

Solución B: Solución acuosa de Sulfanilamida al 0.2%.

Solución C: Solución acuosa de clorhidrato de N- naftil – etilen diamina al 0.1%.

ANEXO 04. Preparación de la muestra por el Método Petroff

Las muestras analizadas por baciloscopía se descontaminaron mediante la técnica Petroff modificado (Laboratorio de control de la tuberculosis, HOMS-1998). La homogenización se realiza con el fin de liberar bacilos del mucus, material celular y tejido en el que está incluido. El procedimiento es el siguiente:

Se agregaron 4 ml de NaOH al 4% a 2ml de muestra se agregó 4 ml luego de homogeneizar con vortex, se dejó reposar durante 15 min. a temperatura ambiente, se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones a 3000RPM durante 15min, se descartó el sobrenadante, agregar 15 ml de solución salina, se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones, descartándose el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 1ml de solución salina y finalmente se inoculo 0.2ml a cada tubo.

Una concentración mayor resultaría más homogenizante, aunque también más letal para las micobacterias, mientras que una concentración menor no provocaría una buena homogenización

ANEXO 05. Preparación de solución de sales para 800ml (medio lote)

Se disolvió 2.4mg de Fosfato monopotásico (KH_2PO_4), 0.24mg de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$), 0.6ml de citrato de magnesio, 3.6mg de L - asparagina, en 600ml de agua destilada y se autoclavó a 121 °C por 15 min.

ANEXO 06. Preparación de huevo homogeneizado 500ml (medio lote)

Se seleccionaron huevos frescos, aproximadamente 30 huevos (500ml) para medio lote, los que se lavan con detergente y enjuaga con agua de caño, limpiándolos luego con algodón y alcohol al 70 %. Después, se batan los huevos en un vaso de precipitación (1000ml) por 15 min., adicionándole 12ml de glicerina y 0.4ml del indicador verde de malaquita, se filtra y se distribuye el medio en los tubos de 20x 125mm en una proporción de 6ml por tubo, evitando la formación de burbujas.

ANEXO 07. Coagulación del medio

Los tubos se colocaron en plano inclinado en el cuagulador y se dejaron a 84 °C por 45 min. (Figura 11), después de la coagulación, se dejaron enfriar los tubos, con la tapa aflojada para evitar la condensación. Los tubos así preparados se guardaron en bolsas de plástico herméticamente cerrados en refrigeración. Los medios pueden mantenerse en buenas condiciones hasta por un mes.

ANEXO 08. Preparación de reactivo de Peter Griess

Primero se prepararon los reactivos en frascos separados y se mantuvo en refrigeración evitando la exposición a la luz.

- Ácido clorhídrico 50%. Disolver 25ml en 25ml de agua destilada estéril. (V/V).
- N- naftil - etilen diamina 0.1. Disolver 50mg en 50 ml de agua destilada estéril. (P/V).
- Sulfanilamida. 0.2%; disolver 100mg en 50ml estéril. (P/V).

Al momento de la lectura de los tubos se procedió a mezclar adecuadamente las tres soluciones en proporción 1: 2: 2, respectivamente y se agregó 0.5ml de la mezcla a cada tubo.

