

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA – MENCIÓN MICROBIOLOGÍA
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO
DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)



EVALUACIÓN DEL ENSAYO SUSCEPTIBILIDAD A
FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS MEDIANTE
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS), COMO
HERRAMIENTA ALTERNA PARA CONTRIBUIR AL
MEJORAMIENTO DEL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS
EXTRAPULMONAR EN LÍQUIDOS ESTÉRILES

Tesis de Grado para obtener el Título de Licenciatura en Bioquímica

POR: Univ. VERONICA CHIPANA CORTEZ

LA PAZ -BOLIVIA

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA – MENCIÓN MICROBIOLOGÍA
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO
DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)



EVALUACIÓN DEL ENSAYO SUSCEPTIBILIDAD A
FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS MEDIANTE
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS), COMO
HERRAMIENTA ALTERNA PARA CONTRIBUIR AL
MEJORAMIENTO DEL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS
EXTRAPULMONAR EN LÍQUIDOS ESTÉRILES

Tesis de Grado para obtener el Título de Licenciatura en Bioquímica

POR: Univ. VERONICA CHIPANA CORTEZ

ASESORA: Dra. ANETH VASQUEZ MICHEL

CO- ASESOR: Dr. RAFAEL TROCHE FERNANDEZ

LA PAZ-BOLIVIA

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA

Tesis de grado:

EVALUACIÓN DEL ENSAYO SUSCEPTIBILIDAD A
FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS MEDIANTE
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS), COMO
HERRAMIENTA PARA CONTRIBUIR AL MEJORAMIENTO
DEL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR
EN LÍQUIDOS ESTÉRILES

Presentada por: Univ. Verónica Chipana Cortez

Para optar el grado académico de Licenciatura en Bioquímica

Nota numeral:

Nota literal:

Ha sido

Director de la carrera de Bioquímica Dr. Bernardo Torrico Arzady

Tutora: Dra. Aneth Vásquez Michel

Tribunal: Dr. David Gutiérrez Yapu

Tribunal: Dr. Gualberto Limache Ormachea

Tribunal: Dr. Sergio Quisberth Barrera

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y nunca abandonarme.

A mi madre Primitiva, por haberme apoyado en todo momento y confiar en todo lo que soñé, pero más que nada por su amor.

A mi padre Genaro, por darme consejos que influyeron en mi vida y cuidarme desde el cielo.

A mis hermanos, por todo su apoyo durante mi vida.

A mi hijo Matthew, que llegó a mi vida a enseñarme muchas cosas que en este mundo se están perdiendo y por ser mi mayor motivación para culminar este trabajo.

A mi asesora, Dra. Aneth Vasquez, por sus enseñanzas, su confianza, su gran apoyo y motivación para la elaboración de esta tesis.

A mi co-asesor Dr. Rafael Troche por su apoyo ofrecido en este trabajo

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a mi asesora la Dra. Aneth Vasquez por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico así como también haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis.

Gracias a todo el personal de los diferentes centros de salud en especial a mi co-asesor Rafael Troche, que contribuyo en la recolección de muestras y datos fundamentales para este trabajo, el cual no hubiese dado frutos sin su apoyo.

Gracias a la Universidad Mayor de San Andrés, por haberme aceptado ser parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar mi carrera, así como también los diferentes docentes que brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante día a día.

Y para finalizar agradezco al Instituto SELADIS, a mis compañeros de clase durante todos los niveles de universidad ya que gracias al compañerismo, amistad y apoyo moral han aportado en un alto porcentaje a mis ganas de seguir adelante en mi carrera profesional.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
4. JUSTIFICACIÓN.....	4
5. PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	5
6. HIPÓTESIS.....	6
7. OBJETIVOS.....	6
7.1. OBJETIVO GENERAL.....	6
7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
8. MARCO TEÓRICO.....	7
8.1. DEFINICION DE TUBERCULOSIS.....	7
8.2. TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR.....	7
8.3. CARACTERISTICAS GENERALES DEL <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
8.3.1. ESTRUCTURA NUCLEAR.....	9
8.3.2. ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR.....	9
8.3.1 PATOGENIA DEL <i>M. tuberculosis</i>	11
8.3.2 PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR.....	12
8.3.1. TUBERCULOSIS MENINGEA.....	14
8.3.2. TUBERCULOSIS PERICARDICA.....	15
8.3.3 TUBERCULOSIS PERITONEAL E INTESTINAL.....	15
8.3.4. TUBERCULOSIS PLEURAL.....	15
8.4. TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR SITUACION EPIDEMIOLOGICA.....	16
8.5. TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR RELACION VIH.....	17

8.6. TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR FARMACORRESISTENTE.....	17
8.6.1. TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR FARMACORRESISTENTE.....	20
8.7. CARACTERISTICAS DE LOS FARMACOS DE PRIMERA LINEA ISONIACIDA Y RIFAMPICINA.....	20
8.7.1. ISONIACIDA.....	20
8.7.1.1. MECANISMO DE ACCION.....	20
8.7.1.2. GENES DE RESISTENCIA EN ISOCIANIDA.....	20
8.7.2. RIFAMPICINA.....	21
8.7.2.1. MECANISMO DE ACCION.....	21
8.7.2.2. GENES DE RESISTENCIA EN RIFAMPICINA.....	22
8.8. DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR.....	22
8.8.1. MEDIO DE CULTIVO OGAWA.....	23
8.8.2. FUNDAMENTO DEL ENSAYO MODS (<i>Microscopic Observation Drug Susceptibility assay</i>).....	24
8.9. TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR.....	26
9. DISEÑO METODOLOGICO.....	27
9.1. FLUJOGRAMA DEL ESTUDIO.....	27
9.1.1. RECOLECCION DE MUESTRAS.....	28
9.1.2. RECOLECCION DE DATOS CLINICOS.....	28
9.1.3. METODO MICROBIOLOGICO CONVENCIONAL CULTIVO OGAWA.....	28
9.1.3.1. PROCEDIMIENTO.....	28
9.1.4. METODO MODS.....	29
9.1.4.1. CONSIDERACIONES GENERALES PARA LAS MUESTRAS.....	29

9.1.4.2. PROCEDIMIENTO.....	29
9.2. TIPO O DISEÑO DEL ESTUDIO.....	31
9.3. SITIO O CONTEXTO DEL ESTUDIO.....	32
9.4. UNIVERSO Y POBLACIÓN O MUESTRA.....	32
9.5 TAMAÑO DE MUESTRA.....	32
9.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
9.7 ASPECTOS BIOÉTICOS.....	33
10. RESULTADOS.....	33
10.1 IDENTIFICACION DEL <i>M. tuberculosis</i> MEDIANTE METODO MICROBIOLOGICO OGAWA.....	33
10.2 IDENTIFICACION DEL <i>M. tuberculosis</i> MEDIANTE EL MOD.....	34
10.3 PERFIL DE SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA SOBRE LAS MUESTRAS POSITIVAS.....	34
10.4 CONCORDANCIA DEL ENSAYO MODS CON EL METODO OGAWA.....	35
10.5 SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DEL MODS FRENTE AL OGAWA.....	36
10.6 TIEMPO DE DETECCION DEL CRECIMIENTO DE <i>M. tuberculosis</i> EN MODS Y EN CULTIVO OGAWA.....	38
11. DICUSION.....	38
12. CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	47

ABREVIATURAS

ADA.- Adenosina deaminasa

ARN.- Ácido ribonucleico

AUC.- Área bajo la curva ROC

BAAR.- Bacilo Acido Alcohol Resistente

DNA.- Ácido desoxiribonucleico

INH.- Isoniacida

IRIS.- Síndrome inflamatorio de reconstitución inmune

LAM.- Lipoarabinomanano

LCR.- Líquido cefalorraquídeo

MDR.- Multidrogorresistente

MODS.- Ensayo Susceptibilidad a fármacos antituberculosos mediante observación microscópica

MTB. - *Mycobacterium tuberculosis*

M. TUBERCULOSIS. - *Mycobacterium tuberculosis*

NaOH.- Hidróxido de Sodio

OMS.- Organización Mundial de la Salud

OPS.- Organización Panamericana de la Salud

OADC.- Complemento Nutritivo compuesto por Albumina bovina, dextrosa, cloruro de sodio, catalasa bovina, ácido oleico.

PANTA.- Mezcla de antibióticos, constituido por ácido nadilixico, anfotericina B, polimixina B, trimetoprima y azlocilina.

PAS.- Acido paraaminosalicílico

PNCT.- Programa Nacional de Control de la tuberculosis

PNO.- Procedimientos Normalizados de Operacion

RIF.- Rifampicina

ROC.- acrónimo de Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor)

SEDES.- Servicio Departamental de Salud

SIDA.- Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SNS.- Sistema Nacional de Salud

SOD.- Superóxido dismutasa

TB.- Tuberculosis

TBEP.- Tuberculosis Extrapulmonar

UFC.- Unidades Formadoras de Colonias

VPN.- Valor Predictivo Negativo

VPP.- Valor Predictivo Positivo

ZN.-Zinc

RESUMEN

La tuberculosis extrapulmonar se define, como a aquella infección producida por *Mycobacterium tuberculosis* que afecta a tejidos y órganos fuera del parénquima pulmonar.

Según el último informe de la OMS 2016, se reportaron 34577 casos de tuberculosis extrapulmonar en las Américas. Obteniendo datos para Bolivia, según el informe de la OPS Y OMS 2013, se reportaron 31536 casos nuevos de tuberculosis extrapulmonar en las Américas y en Bolivia 6622 casos nuevos de Tuberculosis extrapulmonar colocándolo en el cuarto puesto.

El Ogawa es el método convencional gold standar aplicado en nuestro medio para la detección de tuberculosis extrapulmonar en muestras de líquidos estériles.

El ensayo susceptibilidad a fármacos antituberculosos mediante observación microscópica (MODS) se basa en un cultivo en medio líquido que detecta *M. tuberculosis* y evalúa la susceptibilidad frente a los antituberculosos de primera línea Isoniacida y Rifampicina directamente en muestras biológicas del paciente.

El presente trabajo pretende comparar el ensayo MODS con el método convencional cultivo Ogawa, para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar, en La Paz Bolivia.

La población en estudio estuvo constituida por pacientes con sospecha de tuberculosis extrapulmonar, que asistieron al Instituto Nacional del Tórax. Se recolecto muestras de líquidos estériles, las cuales fueron procesadas por el método convencional Ogawa y el ensayo MODS.

De las 50 muestras recolectadas, 2 salieron positivas mediante el Ogawa y 3 mediante el ensayo MODS. Comparando al ensayo MODS con el Ogawa, se obtuvo una fuerza de concordancia buena, así mismo el ensayo MODS obtuvo una sensibilidad del 100% y na especificidad del 97%.

El ensayo MODS también detecta cepas drogorresistentes, en las 3 muestras positivas se observó cepas sensibles a los fármacos de primera línea, Isoniacida y Rifampicina. El ensayo MODS proporcione resultados a partir del día 11, a diferencia del Ogawa que nos proporcionó a partir de los 40 días.

El ensayo MODS resulto ser una herramienta alterna efectiva para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar, ya que fue capaz de detectar al *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de líquidos estériles con una alta sensibilidad, especificidad y mayor rapidez con una inversión económica aceptable para nuestro medio.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, MODS, tuberculosis extrapulmonar, cultivo Ogawa, líquidos estériles.

ABSTRACT

Extrapulmonary tuberculosis defines, as an infection produced by *Mycobacterium tuberculosis* that affects tissues and organs outside the lung parenchyma.

According to the latest WHO report 2016, 34577 cases of extrapulmonary tuberculosis were reported in the Americas. Obtaining data for Bolivia, according to the report of PAHO and WHO 2013, 31536 new cases of extrapulmonary tuberculosis were reported in the Americas and Bolivia 6622 new cases of extrapulmonary Tuberculosis placing it in the fourth place.

Ogawa is the conventional method of gold applied in our environment for the detection of extrapulmonary tuberculosis and samples of sterile liquids.

The microscopic antituberculosis drug susceptibility test (MODS) is based on a liquid medium culture that detects *M. tuberculosis* and evaluates the susceptibility to the first line antituberculosis Isoniazid and Rifampicin directly in the patient's biological samples.

The present work the MODS is searched with the conventional method of Ogawa culture, for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis, in La Paz Bolivia.

The study population consisted of patients with suspected extrapulmonary tuberculosis who attended the National Chest Institute. Samples of essential liquids were collected, probabilities were processed by the conventional Ogawa method and the MODS test.

Of the 50 samples collected, 2 were positive by Ogawa and 3 were positive in the MODS test. Comparing to the MODS test with the eye, a good concordance strength was obtained, and the MODS test obtained a sensitivity of 100% and a specificity of 97%.

The MODS assay also detects drug-resistant strains, in the 3 positive samples strains sensitive to first-line drugs, Isoniazid and Rifampicin were observed. The MODS trial provided results from day 11, a difference of the Ogawa that provided us from the 40 days.

The MODS trial proved to be an alternative tool for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis, since it was able to detect *M. tuberculosis* in samples of liquids with a high sensitivity, specificity and faster with an economic investment acceptable to our environment.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, MODS, extrapulmonary tuberculosis, Ogawa culture, sterile liquids.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis extrapulmonar se define, utilizando los criterios de clasificación de la OMS, como una infección producida por *Mycobacterium tuberculosis* que afecta a tejidos y órganos fuera del parénquima pulmonar. Según datos del informe de la OMS esta enfermedad representa el 20-25% de los casos de tuberculosis. (Lapausa, Saldaña, & Asensio, 2015)

La tuberculosis extrapulmonar es el resultado de la diseminación hematógica y linfática del bacilo de *M. tuberculosis*. Para establecer el diagnóstico se requiere de un elevado índice de sospecha. El retraso en el diagnóstico de las formas extrapulmonares es un hecho frecuente que conlleva un incremento en las tasas de morbilidad y mortalidad. (Lapausa, Saldaña, & Asensio, 2015)

El diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar depende de la probabilidad de encontrar los bacilos en los sitios de infección, los cuales se encuentran en tamaños poblacionales reducidos, excepto si hay caseificación o formación de cavidades, las biopsias del tejido pueden dar resultados positivos en comparación a los fluidos en donde el número de los bacilos se ve disminuido por la dilución. (Jorge Martín Llaca Díaz, 2003). En base a esta información nos centramos en realizar el estudio solo con muestras de líquidos estériles con sospecha de tuberculosis extrapulmonar.

Según el último informe de la OMS 2016, se reportaron 190368 casos de VIH en las Américas, cabe mencionar que la población con tuberculosis pulmonar que presenta coinfección con VIH fue de 6551 casos presentados en Bolivia, es de importancia hacer

énfasis en este último grupo ya que esta población es susceptible a padecer de tuberculosis extrapulmonar. (WHO. Tuberculosis report 2016:)

Según el informe de la OMS 2014, la situación mundial de la tuberculosis extrapulmonar se reportaron 830.165 casos nuevos y 6227 casos de recaída, la situación en las Américas se reportaron 33.777 casos nuevos y 844 casos de recaída. Obteniendo datos para Bolivia, según el informe de la OPS Y OMS 2013, se reportaron en Bolivia 6622 casos nuevos de Tuberculosis extrapulmonar colocándolo en el cuarto puesto. (WHO. Tuberculosis report 2014:)

En nuestro medio el método de referencia para el diagnóstico de *M. tuberculosis* en muestras de líquidos estériles es el cultivo en medio sólido Ogawa; sin embargo; la principal desventaja que presenta este método es el prolongado tiempo que lleva hasta la emisión de resultados, sin contar con los 45 días que toma realizar las pruebas de susceptibilidad a antituberculosos, lo cual provoca un retraso en el inicio del tratamiento del paciente. Sin embargo existen casos en los cuales es posible iniciar un tratamiento únicamente bajo entorno medico.

El ensayo susceptibilidad a fármacos antituberculosos mediante observación microscópica (MODS) se basa en un cultivo en medio líquido que detecta *M. tuberculosis* y evalúa la susceptibilidad frente a los antituberculosos de primera línea Isoniacida y Rifampicina directamente en muestras biológicas del paciente. (Asencios, Acurio, & et, 2011)

Su empleo se sustenta en tres principios importantes: (1) *M. tuberculosis* desarrolla más rápido en medio líquido en comparación al medio solido; (2) permite la posibilidad de la visualizar en los cultivos (microcolonias) que presentan forma de cordón en medio

liquido bajo un microscopio invertido en una etapa temprana y (3) que la incorporación de las drogas Isoniacida y Rifampicina permite una rápida y directa detección de sensibilidad en forma simultánea con la observación del crecimiento bacteriano. La mayor ventaja de este método es que nos permite obtener resultados tanto de detección del bacilo como de susceptibilidad a fármacos en un máximo de 20 días. (Asencios, Acurio, & et, 2011)

El ensayo MODS, está siendo utilizado actualmente como método de diagnóstico de **TB pulmonar** de rutina en muchos países; entre los que se encuentran Chile, Perú, Argentina y recientemente fue validado en Bolivia (datos no publicados); debido a los altos valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos que el ensayo demuestra en diferentes estudios. Sin embargo no se cuenta con muchos datos que demuestren su verdadera efectividad en el diagnóstico de TB extrapulmonar.

Es por ello que el presente estudio pretende evaluar este método para el diagnóstico de TB extrapulmonar, a través de su comparación con métodos de cultivo microbiológico que son el Gold estándar y así poder determinar si su aplicación para el diagnóstico de TB extrapulmonar es factible en nuestro medio.

2. ANTECEDENTES

Según el último informe de la OPS Y OMS 2013, se reportaron 31536 casos nuevos de tuberculosis extrapulmonar en las Américas y en Bolivia 6622 casos nuevos de Tuberculosis extrapulmonar colocándolo en el cuarto puesto después de Costa Rica. (WHO. Tuberculosis report 2014:) En un reporte del ministerio de salud, se informo que en la

gestión 2014 en Bolivia se notificaron, 1.636 casos de tuberculosis extrapulmonar. (Ministerio de Salud, 2015)

La técnica MODS como una alternativa de diagnóstico en nuestro medio presentó resultados interesantes llegando a obtenerse una sensibilidad de 96%, especificidad de 93%.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el año 2013, el MODS se calificó como un método aprobado para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. El fin de este trabajo es verificar si el método MODS puede contribuir al diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar en nuestro medio.

4. JUSTIFICACIÓN

El sistema nacional de salud (SNS) está inmerso en un proceso de cambio y fortalecimiento, donde la calidad de la atención en salud incluida el diagnóstico certero y rápido sigue siendo la dirección principal. El Programa Nacional de Control de la Tuberculosis (PNCT) avanza hacia la posible eliminación de la enfermedad, en la cual el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas para el control de la enfermedad es crucial.

Usualmente se realizan procesos de evaluación de la calidad en la ejecución de los métodos de diagnóstico de rutina del PNCT, pero poco se hace para mejorar estos métodos que en caso de demostrar ser aplicables serán de gran aporte no solo a la microbiología sino especialmente a la sociedad en general, permitiendo al paciente acceder a un diagnóstico acertado, apoyando al personal médico, a la aplicación de

tratamientos más eficaces y por ende acortar la cadena de transmisión y mejorar la calidad de vida en nuestro país.

El realizar estudios multidisciplinarios de este tipo, permite ineludiblemente la participación activa directa del bioquímico en la solución de las dificultades y deficiencias de los servicio de diagnóstico que se presenta actualmente. Para ello, deberán ser portadores de ese cambio cualitativo.

Para lograr el diagnóstico certero y confiable de tuberculosis extrapulmonar se utilizan varios métodos de cultivo que son muy tardíos incrementando el periodo de convalecencia por retraso en la aplicación de medicación al paciente y prolongando la duración de la enfermedad.

El ensayo MODS es una alternativa que se basa en un cultivo en medio líquido que detecta *M. tuberculosis* y evalúa la susceptibilidad frente a los antituberculosos de primera línea Isoniacida y Rifampicina directamente desde muestras biológicas del paciente, lo que permite iniciar un tratamiento correcto y directo; hecho que es vital para el paciente y presenta un mayor impacto si se diagnostica una tuberculosis extrapulmonar por cepas resistentes a antituberculosos.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Podría ser el ensayo MODS un método con valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos aceptables, con respecto al método gold estándar constituido por el cultivo para el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar, de manera que pueda ser aplicado en nuestro medio?

6. HIPÓTESIS

El ensayo MODS es un método aplicable en el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar (líquidos estériles) ya que demostrará valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos mayores a 90%

7. OBJETIVOS

7.1. OBJETIVO GENERAL

✓ Determinar el valor diagnóstico del ensayo de susceptibilidad a fármacos antituberculosos mediante observación microscópica (MODS), como herramienta para el diagnóstico de Tuberculosis Extrapulmonar, en muestras de líquidos estériles.

7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Identificar cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de líquidos estériles mediante métodos microbiológicos convencionales.

✓ Identificar cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de líquidos estériles mediante el ensayo MODS.

✓ Detectar cepas resistentes a los fármacos Isoniacida y Rifampicina (MDR-TB), mediante el método MODS

✓ Determinar los valores de concordancia del método MODS y el cultivo microbiológico convencional.

✓ Estimar los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de MODS frente al cultivo Ogawa.

✓ Comparar el tiempo de detección del crecimiento de *M. tuberculosis* en medio de cultivo Ogawa (método convencional) y en MODS.

8. MARCO TEÓRICO

8.1. DEFINICION DE TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una infección producida por el *Mycobacterium tuberculosis hominis*, también llamado *Bacilo de Koch*, en honor a su descubridor. Se trata de una enfermedad de localización preferentemente pulmonar, pero que no solo afecta al pulmón propiamente dicho sino que afecta también a los ganglios hiliares vecinos, a los bronquios y a la pleura. Además de esto, también existen formas de tuberculosis que afectan a otros órganos, como cerebro y meninges, hueso, hígado, riñón, piel, etc. (DocPlayer, 2016)

8.2. TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR

Se denomina TB extrapulmonar (TBEP) a aquella que afecta a cualquier localización no pulmonar, incluyendo la pleural y la linfática intratorácica, cuando no hay

afectación del parénquima pulmonar. (Dra. Valeria Yesica, 2012). Representan el 20-25% de los casos de enfermedad tuberculosa. (Lapausa, Saldaña, & Asensio, 2015). No suelen ser contagiosas y, al igual que en la tuberculosis pulmonar, estas bacterias van destruyendo los tejidos de los órganos en los que se encuentran. (Gastón, 2015)

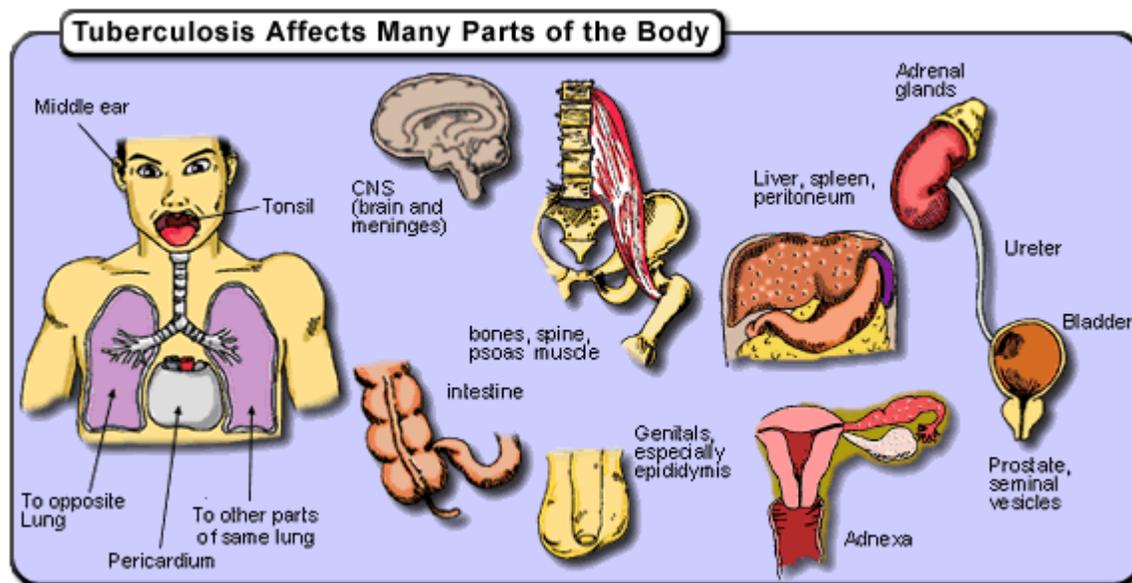


FIGURA 1. Representación sobre las partes afectadas del ser humano por el *Mycobacterium tuberculosis* ocasionando una tuberculosis extrapulmonar.

Fuente: <https://soniadiarteg.wordpress.com/unidad-4/>

8.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL *Mycobacterium tuberculosis*

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos largos o curvos en forma de maza de 3 a 5 μm de longitud, inmóviles, no esporulados, con abundantes gránulos citoplasmáticos, que poseen una resistencia mayor a la tinción por los colorantes comunes, pero una vez teñidos son resistentes a la decoloración con una mezcla de

alcohol ácido. Desde el punto de vista de los requerimientos atmosféricos algunos son aerobios y otros microaerófilos. En cuanto a la velocidad de crecimiento algunas especies son de crecimiento rápido y otro lento. (Rodríguez, 2002)

8.3.1. ESTRUCTURA NUCLEAR

Las características hereditarias de todo ser viviente están determinadas por la estructura del genoma. El material genético de una célula está compuesto por ácido desoxirribonucleico (DNA) organizados en uno o más cromosoma (el material genético es denominado como el genoma de un organismo).

Como sabemos, toda célula existente en el planeta tierra, posee un genoma que se encarga de transmitir y expresar su información genética. En el caso de las células procariotas, el genoma o DNA está compuesto por un único cromosoma o DNA de doble hélice en forma circular. (A esta forma se le denomina nucleoide, el cual no se encuentra unido a la membrana celular de la bacteria y está suelto en el citoplasma.

La secuencia del genoma de las Micobacterias, en promedio, comprende al menos 400 genes. El DNA mide aproximadamente de 300 a 1400 um de largo y se presenta en la célula superenrollado (la molécula de cadena doble está enrollada sobre sí misma como una banda elástica entrelazada.).

8.3.2. ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR

La pared celular de las Micobacterias contiene una capa de peptidoglicano, cuya estructura es similar a la encontrada en las paredes de las bacterias gramnegativas, denominado: lipoarabinomanano (LAM), esta molécula es compleja, y se extiende desde la membrana plásmatica hasta la superficie celular. El LAM es análogo desde el punto de

vista estructural y funcional al lipopolisacárido de las bacterias gramnegativas. El peptidoglicano está unido a un polisacárido ramificado llamado arabinogalactano por enlaces fosfodiéster. Los extremos distales del arabinogalactano están esterificados con el ácido micólico de alto peso molecular. Estos glucolípidos de alto peso molecular tienen un esqueleto carbonado cuya longitud oscila entre C78 Y C90. En *Mycobacterium tuberculosis*, el único ácido micólico 6,6'-dimicoliltrehalosa es conocido como el factor cordón.

El complejo peptidoglicano-ácido micólico-arabinogalactano forma el esqueleto de las paredes celulares de las micobacterias. Las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos micólicos están intercaladas con los numerosos lípidos y glucolípidos asociados con la pared. Los lípidos asociados con la pared incluyen grupos acil grasos de longitud media (C24 A C36) y corta (C12 a C20).

Los lípidos de la pared celular de las micobacterias vuelven hidrófoba a la Micobacteria, esta capacidad hace que las micobacterias sean resistente a la coloración con tinciones básicas de anilina, a menos que éstas se apliquen con calor o detergentes, o durante periodos prolongados. Las micobacterias resisten a la decoloración con una mezcla de 3 % de ácido clorhídrico y 95 % de etanol, propiedad que las define como bacilos acido-alcohol-resistentes (BAAR). Es por esta propiedad, que las Micobacterias, deben ser teñidas con una mezcla de fenol y fucsina (técnicas de Ziehl-Neelsen/Kinyoung), o con los fluorocromos (Auramina y Rodamina). (FCQ, 2016)

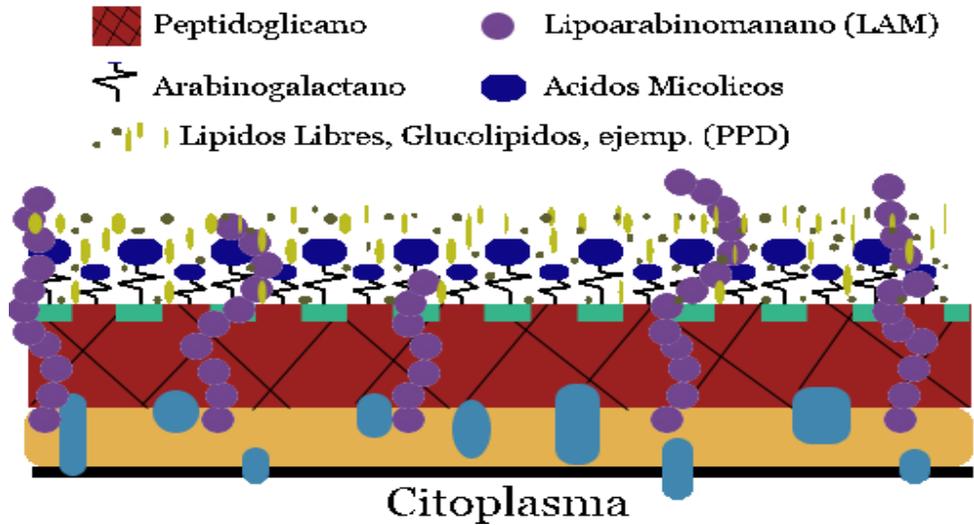


FIGURA 2. Representación esquemática de la pared celular del *Mycobacterium tuberculosis*

Fuente: http://www.fcq.uach.mx/phocadownload/DOCENCIA/MATERIAL-DE-ESTUDIO/micobacterias/biologia/biologia_de_las_micobacterias.html

8.3.1 PATOGENIA DEL *M. tuberculosis*

Los bacilos de la TB son parásitos intracelulares facultativos (desarrollan dentro y fuera de las células del hospedador) que se transmiten principalmente por las vías inhalatoria, oral sobre todo en los niños que ingieren leche de bovinos enfermos, cutánea y oftálmica. Se considera que el microorganismo no produce toxinas, si bien se ha comprobado cierta capacidad leucotóxica en algunos de sus componentes estructurales. En este sentido, los factores de patogenicidad detectados hasta ahora en el complejo *M. tuberculosis* se mencionan a continuación:

1. El factor cordón o factor serpiente, que corresponde al micósido (glucolípidos) 6,6'-dimicoliltrehalosa y que, además de ser el responsable de la disposición micobacteriana en paralelo y cadenas (*in vitro*), es altamente tóxico para los leucocitos:

les inhibe la acción de la succinato deshidrogenasa, provoca el hinchamiento de sus mitocondrias y separa a los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso.

2. Los sulfolípidos, que actúan como fagolisosomasa (impidiendo la fusión lisosoma fagosoma en los fagocitos) y potencian la capacidad del factor cordón.

3. El complejo superóxido dismutasa (SOD)/catalasa, que neutraliza el poder oxidante de los iones superóxido (O_2^-) y del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), presentes en los lisosomas de los fagocitos. (DEPA.FQUIM, 2015)

8.3.2 PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR

El mecanismo de producción de la tuberculosis extrapulmonar puede ser a partir de la Primoinfección tuberculosa o de la tuberculosis extrapulmonar a partir de la TB de reinfección.

Primoinfección tuberculosa

La primoinfección tuberculosa se produce ya sea a partir de la lesión inicial o efecto primario en un punto de entrada y de allí a un ganglio vecino con caseificación local (Complejo Primario) el cuál cura en la inmensa mayoría de los casos para siempre o de forma pasajera, para extenderse esta última cuando existe un proceso de Inmunodepresión.

Los bacilos en el organismo se diseminan por varias vías, entre ellas: Hemática, linfática y canalicular que se explican a continuación:

· La vía hemática al llegar gran cantidad de bacilos a la sangre brotan tubérculos miliares en casi todos los órganos ya sea:

1. por reblandecimiento de los tubérculos caseificados de la íntima de los vasos sanguíneos arteriales que viajan por el sistema vascular.

2. por reblandecimiento de los tubérculos caseificados de la íntima de los vasos linfáticos fundamentalmente del conducto torácico y penetran al sistema vascular.

3. por un mecanismo de ulceración vascular del propio foco caseoso.

· La vía linfática se presenta fundamentalmente en las primeras edades de la vida desarrollándose una linfangitis o adenitis tuberculosa.

· La vía canalicular cuando un foco encuentra salida por cualquier canal, extendiéndose en el órgano, a otros vecinos y a distancia, como ocurre en la TB en tráquea, laringe, riñón.

La invasión de las cavidades serosas por cualquiera de estas vías puede colonizar y provocar pleuritis, peritonitis, meningitis, pericarditis, sinovitis.

Tuberculosis Extrapulmonar

En el caso de la tuberculosis extrapulmonar a partir de la TB de reinfección se puede producir por las siguientes vías:

Vía Exógena siempre con tuberculosis pulmonar previa y su progresión a caseosis y ruptura con descargas bacilíferas por vía broncógena, hacia laringe, deglutirse y manifestarse a nivel intestinal siempre que hayan las condiciones favorables para ello.

Vía Endógena: reactivación del foco primario de la primoinfección TB y sus vías, ya expuesta.

El proceso de caseosis y su licuefacción comprende liberación de endotoxinas y exotoxinas, entre enzimas y otras sustancias que provocan un estado de hipersensibilidad alérgica. La historia natural y los distintos síndromes derivados de la infección TBC están

íntimamente ligados a las defensas del huésped. Es muy importante saber que el bacilo no elabora estas endotoxinas ni exotoxinas, por el contrario; la enfermedad en sí y la destrucción tisular son ocasionadas por productos que elabora el propio huésped durante la respuesta inmunitaria para detener la infección. Conforme las defensas aumentan, los focos granulomatosos (caseos) de las distintas regiones involucionan y tienden a desaparecer calcificándose. Sin Embargo cuando la respuesta inmunitaria es subóptima la primera infección, avanza con rapidez hacia el estadio clínico de la enfermedad, ya sean pulmonares o extrapulmonares. (Suarez, 2015)

8.3.1. TUBERCULOSIS MENINGEA

La meningitis tuberculosa es la infección más grave causada por *Mycobacterium tuberculosis*, siendo causa de muerte o daño neurológico grave en más de la mitad de los pacientes afectados, tanto en países en desarrollo como desarrollados; esto a pesar de contar actualmente con tratamiento antituberculoso. (Aguirre J. M., 2006)

PATOGENIA

Pueden desarrollarse lesiones tuberculosas de cerebro, tuberculomas, que pueden producir síndromes de hipertensión endocraneana, compromiso de los nervios craneanos, y acompañarse de infarto cerebral, hidrocefalia, atrofia cortical, etc.

La resonancia magnética nuclear contrastada puede proveer un diagnóstico temprano en el compromiso tuberculoso del sistema nervioso central, particularmente demostrando las lesiones localizadas, el aumento de las meninges y las características del tronco cerebral (Enfermería tipos de TB, 2016)

8.3.2. TUBERCULOSIS PERICARDICA

La afección del pericardio es poco frecuente, y a menudo difícil de diagnosticar. (Enfermería tipos de TB, 2016). Pericarditis es una rara manifestación de la tuberculosis y en algunos casos puede ser fatal. (Arturo Hechavarria, 2014). La infección llega al pericardio por vía linfática, o por contigüidad.

8.3.3 TUBERCULOSIS PERITONEAL E INTESTINAL

La mayoría de los casos de tuberculosis peritoneal son resultado de la reactivación de un foco pulmonar latente establecido previamente por vía hematógena y no aparente al estudio radiológico. Sólo una sexta parte de los casos está asociada a un foco pulmonar activo.

La vía de diseminación más frecuente es la vía hematógena a cualquier otro punto del organismo y, finalmente, por contigüidad al afectarse cualquier órgano retroperitoneal o pélvico. Conforme la enfermedad progresa, el peritoneo parietal y visceral se cubre con “tubérculos”, pudiéndose observar ascitis en 97% de cantidad variable o puede ser encontrado como una fase fibro adhesiva que suele expresarse en forma “seca”. (Oscar Alejandro Farías Llamas, 2005)

8.3.4. TUBERCULOSIS PLEURAL

La tuberculosis pleural constituye la manifestación extrapulmonar más frecuente de dicha infección y se presenta con frecuencia variable, según el país, en hasta un 30% de los pacientes con tuberculosis independientemente de la coinfección por VIH.

La mycobacteria invade directamente la cavidad pleural a través de la ruptura de focos caseosos subpleurales alrededor de 6 a 12 semanas después de la infección primaria.

Los antígenos de las proteínas del bacilo inducen una reacción de hipersensibilidad tardía que estimula la secreción de citoquinas que a su vez activan a los macrófagos, alteran la permeabilidad de los vasos pleurales y causan la formación de granulomas. El derrame pleural es consecuencia de la inflamación pleural granulomatosa aguda y de la salida de líquido desde nidos subpleurales hasta el espacio pleural.

8.4. TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR SITUACION EPIDEMIOLOGICA

Según el último informe de la OMS 2014, la situación mundial de la tuberculosis extrapulmonar se reportaron 830.165 casos nuevos y 6227 casos de recaída, viéndose que en India se reportaron 226557 casos de tuberculosis extrapulmonar, poniéndolo en el número uno de los países con alta prevalencia de esta enfermedad, seguido de Pakistán y Etiopía.

La situación en las Américas se reportaron 33.777 casos nuevos y 844 casos de recaída. Obteniendo datos para Bolivia, según el último informe de la OPS Y OMS 2013, se reportaron 31536 casos nuevos de tuberculosis extrapulmonar en las Américas, viéndose que Canadá es el país con más prevalencia de esta enfermedad y Bolivia se encuentra en el cuarto lugar con 6622 casos nuevos de Tuberculosis extrapulmonar. (WHO. Tuberculosis report 2014:). En un reporte del ministerio de salud, se informó que en la gestión 2014 en Bolivia se notificaron, 1.636 casos de tuberculosis extrapulmonar. (Ministerio de Salud, 2015)

8.5. TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR RELACION VIH

Al infectarse con el *M. tuberculosis* cada persona adquiere un riesgo del 10% de padecer la enfermedad en algún momento de su vida. Estos riesgos aumentan notablemente cuando la persona tiene coinfección con el VIH o sufre procesos de inmunosupresión por cualquier otra razón. (Vasquez Jhoanna, 2008)

La tuberculosis extrapulmonar está más estrechamente asociada al VIH que la pulmonar, y la combinación de ambas es especialmente indicativa de una infección por este virus. La tuberculosis extrapulmonar relacionada con el VIH es un diagnóstico de estadio clínico 4 de la OMS (SIDA avanzado); los pacientes afectados padecen a menudo una infección diseminada y el riesgo de deterioro clínico rápido y muerte es muy alta. (OMS, 2007)

8.6. TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR FARMACORRESISTENTE

Poca información existe sobre el tratamiento de la TB extrapulmonar resistente. El riesgo de fracaso puede estar determinado por la poca penetración de los medicamentos a los tejidos afectados. La mejor información disponible se tiene de la TB meníngea y cerebral. Se conoce la buena penetración al líquido cefalorraquídeo de la isoniazida, pirazinamida, cicloserina y etionamida. El etambutol, los aminoglucósidos, la rifampicina y el PAS penetran mejor con las meninges inflamadas; las quinolonas tienen penetración variable. (OPS, 2013)

Todo ser vivo durante su división puede presentar cambios en su genoma (mutaciones) que le pueden dar propiedades nuevas los bacilos tuberculosos tienen una

alta mutagenicidad que les da la propiedad de presentar resistencia natural a los diferentes medicamentos sin haber sido expuesta a los mismos previamente, fenómeno que se produce fundamentalmente en poblaciones bacilares de crecimiento rápido. (Ministerio de Salud y Deportes, 2012)

En la actualidad, el retraso diagnóstico y terapéutico y el no cumplimiento correcto de los tratamientos han complicado el panorama de estas enfermedades, con la aparición de cepas con resistencia múltiple a fármacos. (Antonio Guerrero, 1999)

En la literatura médica existe información muy limitada respecto a la tuberculosis (TB) fármacorresistente extrapulmonar. Muchas de las series de casos de tuberculosis multifármacorresistente (MDR) describen casos con enfermedad extrapulmonar sin mencionar específicamente los resultados o las modificaciones en el tratamiento. Algunas formas de TB extrapulmonar pueden beneficiarse de un desbridamiento o resección quirúrgica con el fin de disminuir la carga de la enfermedad. La cirugía no reemplaza el tratamiento médico completo de la TB, pero ofrece una posibilidad de éxito mayor y puede proporcionar al paciente algo de alivio sintomático mientras que la enfermedad se trata médicamente. (Medicine.ufl)

8.6.1. TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR FARMACORRESISTENTE

El tratamiento de la TB fármacorresistente extrapulmonar es complejo por varios factores:

Muchas formas de TB extrapulmonar (meningitis/pericarditis) son tratadas con un tratamiento suplementario de corticoesteroides en conjunto con un esquema

antituberculoso óptimo. El uso de corticoesteroides en pacientes que no recibieron una terapia antimicobacteriana adecuada puede presentar problemas. Se han reportado estudios que demuestran la eficacia de la terapia con corticoesteroides en casos fármacosusceptibles. La prescripción de corticoesteroides en pacientes con TB fármacorresistente aún no es clara.

Se sabe que algunas formas de TB (particularmente la escrófula y la adenopatía intratorácica) tienden a empeorar mientras se está tratando exitosamente la TB. Esto se debe a reconstitución inmune mientras que el organismo está siendo eliminado y es particularmente común en pacientes infectados con VIH.

Este fenómeno se conoce como una “reacción paradójica” o síndrome inflamatorio de reconstitución inmune (IRIS). Sin embargo, si la recaída clínica se debe en efecto a la falla microbiológica asociada con la fármacorresistencia no detectada (o aún no diagnosticada), puede ser equivocadamente atribuida a una reacción paradójica. En este caso, el diagnóstico correcto (la fármacorresistencia y la falla terapéutica) puede demorarse.

Los esquemas de medicamentos y la duración del tratamiento para la TB extrapulmonar fármaco susceptible se basan en la penetración conocida de medicamentos antituberculosos de primera línea en los tejidos, años de experiencia y en algunos ensayos clínicos. Desafortunadamente, se conoce muy poco en relación a la penetración de medicamentos de segunda línea en los tejidos. A esto se suman las tasas incrementadas de mala absorción e interacción medicamentosa que presentan los individuos con alto riesgo de TB fármacorresistente.

Con frecuencia no hay disponibilidad de cultivos seriales. Las evaluaciones clínicas y radiográficas deben usarse para determinar la duración de la terapia. Con frecuencia la tomografía computarizada es útil en el seguimiento del progreso del tratamiento en estos pacientes.

8.7. CARACTERISTICAS DE LOS FARMACOS DE PRIMERA LINEA ISONIACIDA Y RIFAMPICINA

8.7.1. ISONIACIDA

Constituye el fármaco primario en la quimioterapia antifimica y todos los enfermos con el cuadro causado por cepas del bacilo tuberculoso sensible a isoniacida deben recibirla si la toleran. (Vademecum)

8.7.1.1. MECANISMO DE ACCION

La isoniacida (INH) es un antituberculoso bactericida sintético que solamente es activo contra micobacterias. Actúa en la pared celular micobacteriana en fase de división, inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos (constituyente esencial y específico para su reproducción), mediante el bloqueo de la enzima micolato sintetasa. Actúa específicamente sobre *Mycobacterium tuberculosis* y algunas micobacterias atípicas (*Mycobacterium bovis*). (CECMED, 2015)

8.7.1.2. GENES DE RESISTENCIA A ISONIAZIDA

La isoniazida, forma hidrácida del ácido nicotínico, es una prodroga de gran actividad sobre *M. tuberculosis* con una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de

0,05 µg/ml, que al ser captada por la bacteria, es activada por el sistema catalasa-peroxidasa a la forma activa, el ácido nicotínico, de manera que la ausencia de actividad catalasa, debido a mutaciones en el gen *katG*, codificante de esta enzima, es uno de los mecanismos de resistencia a la isoniazida. El mecanismo de acción es la inhibición específica de la síntesis de ácidos micólicos, sin afectar la de otros ácidos grasos.

Gen *inhA*, la enzima enoil ACP reductasa codificada por gen *inhA*, está involucrada en los pasos de elongación de ácidos grasos del *M. tuberculosis* y se ha identificado como blanco de acción de la isoniazida. La isoniazida activada interfiere con la síntesis de ácido micólico por inhibición de la NADH dependiente de la enoil ACP reductasa. La mutación del gen *inhA*, que la codifica explica aproximadamente el 25% de los casos de resistencia a isoniazida.

Los genes *oxyR* y *ahpC* están estrechamente relacionados, con transcripción inversa. Sorprendentemente, el gen *oxyR*, fue inactivado naturalmente, por acumulación de múltiples alteraciones genéticas, incluyendo mutación con cambio, mutaciones puntuales y deleciones

8.7.2. RIFAMPICINA

Este es un grande y complejo derivado semisintético de rifampicina, un antibiótico producido por *Streptomyces mediterranei*; es activo in vitro contra coco gram positivos y gram negativos, algunas bacterias entéricas, micobacterias y Chlamydia. (Vademecum)

8.7.2.1. MECANISMO DE ACCION

La actividad biológica de la Rifampicina se basa en la inhibición de la síntesis de ARN dependiente de ADN, la cual se debe a la alta afinidad de esta por la ARN

polimerasa de las células procariotes. Los datos obtenidos mediante la cristalización de la unión del fármaco con la ARN polimerasa, indican que la Rifampicina bloquea la síntesis de la cadena de ARN, provocando fuertes conflictos con los enlaces estéricos del oligonucleótido en crecimiento. Su naturaleza lipofílica hace que sea un buen candidato para el tratamiento de las meningitis producidas por *Mycobacterium tuberculosis*, que requieren de distribución a través del sistema nervioso central y una buena penetración a través de la barrera hematoencefálica. (Vademecum)

8.7.2.2. GENES DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA

La rifampicina actúa como bactericida interfiriendo con la síntesis de ARN mensajero al unirse a la ARN polimerasa, que está compuesta por cuatro subunidades diferentes codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*. Las micobacterias desarrollan resistencia a rifampicina mediante mutaciones en una región definida de la subunidad β de la ARN polimerasa, que es codificada por el gen *rpoB*. Estudios comparativos de secuencias de *rpoB*, mostraron seis regiones altamente conservadas (regiones I a VI) y en las cuales se han encontrado la mayoría de las mutaciones en el gen relacionadas con la resistencia a la rifampicina.

8.8. DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR

La TB, tanto pulmonar como extrapulmonar, no presenta ningún signo radiológico patognomónico. Así, aunque existan lesiones radiológicas altamente sugestivas de TB (cavitaciones de lóbulos superiores) y se acompañen de clínica compatible y una situación epidemiológica favorable, nunca se debe admitir el diagnóstico de esta enfermedad con un

simple estudio radiológico y éste sólo indicara que se deben realizar los estudios microbiológicos oportunos. (Luna, 2003)

La TB extrapulmonar al ser menos común y afectar órganos de difícil acceso, es menos conocida y por contener menos bacilos su diagnóstico es mucho más difícil. En el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar se requiere la toma de muestras de secreciones, líquidos corporales y/o biopsia de los tejidos, a los cuales se les debe realizar baciloscopia y cultivo. Es necesario recordar que la recolección de muestras se debe realizar con las mayores medidas de asepsia y enviarlas en envase estéril. (Doc Player)

8.8.1. MEDIO DE CULTIVO OGAWA

El medio de Ogawa - Kudoh es uno de los medios recomendados como útiles a nivel clínico para aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* es el medio más utilizado para este propósito. El medio básicamente está constituido por un conjunto de sales tales como Citrato de Magnesio, Sulfato de Magnesio, Glutamato de Sodio, Fosfato disódico, Fosfato monopotásico anhidro, además incorpora glicerol, verde de malaquita y homogenizado de huevo; esta mezcla debe tener un pH de 6.4, el medio se dispensa en tubos de 20x125 mm y se coagula inclinado a $78^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Por 45- 60 minutos.

Al término del periodo de incubación la ausencia de crecimiento bacteriano indica que la muestra procesada no contiene micobacterias. Por el contrario la presencia de colonias circulares amarillentas debe estudiarse con coloración ZN y pruebas complementarias para confirmar el género y la especie, dato de gran importancia para el clínico. (Biobacter, 2015)

8.8.2. FUNDAMENTO DEL ENSAYO MODS (*Microscopic Observation Drug Susceptibility assay*)

El ensayo MODS se basa en un cultivo directo de muestras de esputo en medio líquido, que detecta *Mycobacterium tuberculosis* y evalúa la susceptibilidad frente a Isoniacida y Rifampicina directamente de dichas muestras. El método se basa en que el crecimiento bacteriano en forma de cordones se visualiza tempranamente en medio líquido a través de un microscopio de luz invertida. (Perú, M., 2011) (anexo 1)

La simplicidad de la técnica, la gran sensibilidad del medio y el crecimiento característico de *M. tuberculosis*, la evaluación de la susceptibilidad frente a drogas en un corto tiempo y el bajo costo de los reactivos, son sus mayores ventajas. El método se basa en la observación de cordones característicos de *Mycobacterium tuberculosis* cuando crece en medio líquido, los cuales son visualizados tempranamente mediante el uso de un microscopio luz invertida. El método, ha sido diseñado para la detección del crecimiento de MTB y la susceptibilidad a INH y RIF. La simplicidad de la técnica, la gran sensibilidad, la especificidad y el bajo costo son las mayores ventajas para su uso en países en vías de desarrollo. (Perú, M., 2011)

LIQUIDOS ESTERILES

El diagnóstico de tuberculosis pleural es realizado mejor con una combinación de pruebas de diagnóstico. El cultivo del líquido pleural puede ser útil, tal como la estimación de la concentración de adenosina deaminasa (ADA) y la citología del líquido pleural. Sin embargo, el cultivo del tejido pleural obtenido por biopsia combinado con el examen histológico proporciona el más sensible combinado enfoque.

El frotis para el examen microscópico del líquido pleural rara vez es útil; el examen microscópico del frotis del material obtenido por biopsia es informativo ocasionalmente. La decontaminación de muestras de líquido pleural reduce la sensibilidad del cultivo con MODS sin afectar significativamente la tasa de contaminación de los cultivos es por ello que no es recomendado.

Hasta donde sabemos no existen datos publicados que comparen el desempeño del MODS con otras metodologías de diagnóstico para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en líquido pericárdico y líquido sinovial. La decontaminación de las muestras de estos fluidos no se considera necesaria antes del cultivo, pero cuando hay sospecha que la muestra no es estéril, la muestra puede dividirse en dos volúmenes iguales, uno es usado para ser decontaminado y el otro para la inoculación directa. (MODS PERU, 2008)

LCR

Maxine comenta en su PNO de laboratorio "La prueba de susceptibilidad directa a drogas con MODS aun no está validado para muestras de LCR - el bajo número de colonias en los pozos libres de drogas excluye la lectura de los pozos que contienen drogas. Por esta razón, en Vietnam, lugar con la mayor experiencia cultivando LCR utilizando el método de MODS, este método es utilizado solo para la detección y no para pruebas de susceptibilidad directa a drogas. A través de este enfoque los cultivos positivos, que por lo general aparecen dentro de las 2 semanas, pueden ser cosechados más rápidamente que los cultivos convencionales para realizar luego pruebas de susceptibilidad indirecta. Además en Vietnam, son utilizados placas de 48 pozos en lugar de placas de 24 pozos." Inoculando la muestra concentrada de LCR en un solo pozo ofrece una mejor sensibilidad que dividir la muestra en varios pozos. (MODS PERU, 2008)

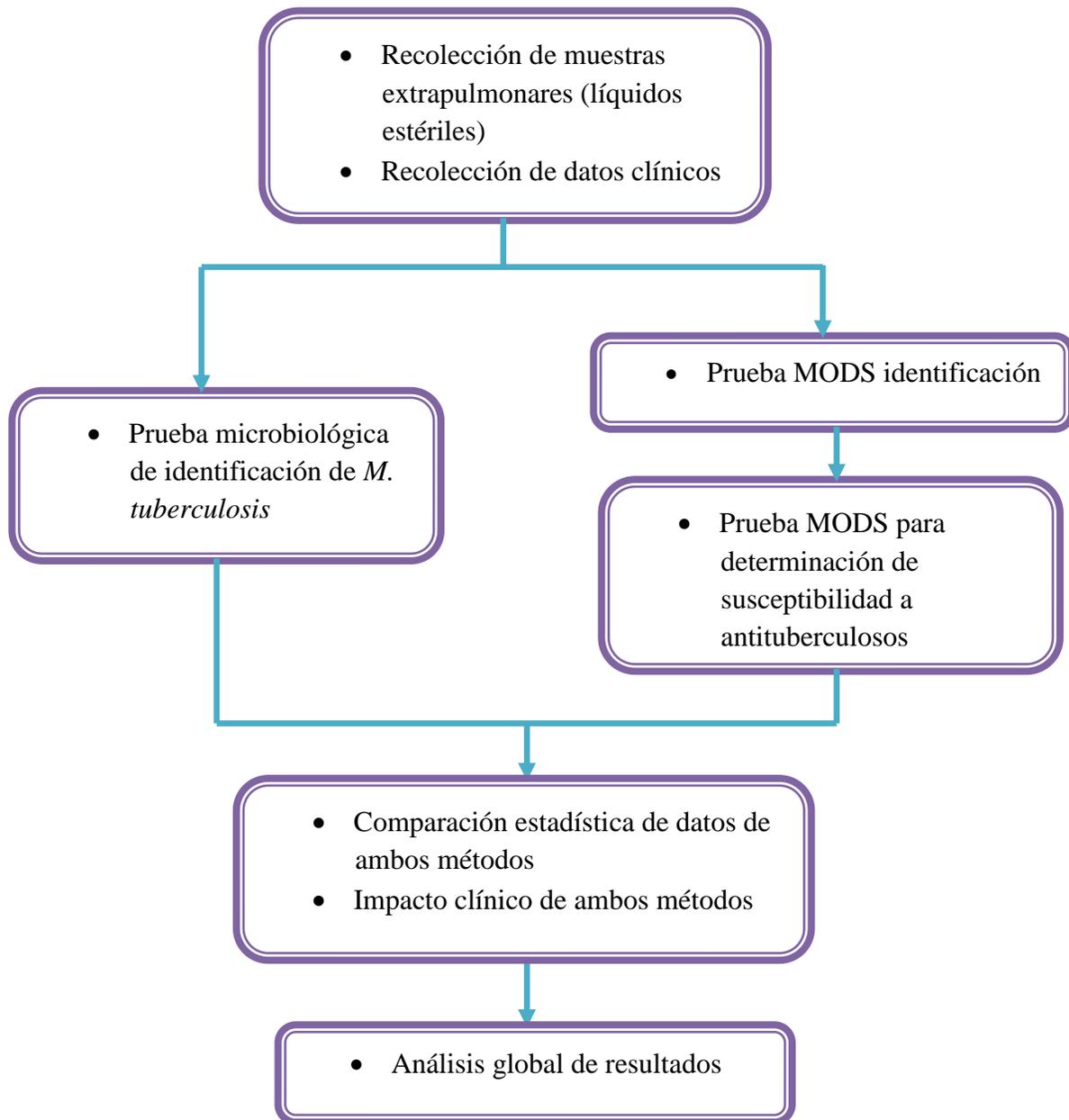
8.9. TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR

El tratamiento de la tuberculosis extrapulmonar de casos nuevos es el mismo que se sigue para tratar la tuberculosis pulmonar. Meningitis tuberculosa. Es la forma extrapulmonar de mayor riesgo para la vida, dejando secuelas permanentes en el paciente. El paciente debe estar hospitalizado. Se recomienda utilizar corticoide como la prednisona en dosis de 2 mg/Kg/día por 3 semanas, reducir gradualmente hasta llegar a la dosis de mantenimiento. El tratamiento antituberculoso es el mismo: 2RHZE/4RH, se recomienda prolongar la segunda fase 3 meses más (hasta completar 9 meses en casos de tuberculoma). (Ministerio, 2009)

La asociación de fármacos viene determinada por la existencia de diferentes poblaciones de bacilos tuberculosos: población bacilar de crecimiento rápido y de localización extracelular que es destruida selectivamente por las hidracidas; población de crecimiento intermitente y extracelular, que es destruida selectivamente por la rifampicina; población de crecimiento lento, de localización intracelular, que es destruida selectivamente por la pirazinamida; y población latente, constituida por bacilos durmientes de forma permanente, sobre la que probablemente no actúa ningún fármaco, y que suele ser destruida por las defensas del organismo. De todo lo anteriormente expuesto se deduce que la asociación de ideal de fármacos para el tratamiento de la tuberculosis es la que actúa sobre las diferentes poblaciones bacilares. (Palacín, 1994)

9. DISEÑO METODOLOGICO

9.1. FLUJOGRAMA DEL ESTUDIO



9.1.1. RECOLECCION DE MUESTRAS

Las muestras de líquidos estériles fueron recolectadas por el laboratorio de cultivo del Tórax, se tomó en cuenta las características de la muestra, estas se deberían encontrar en su respectivo envase con la tapa asegurada sin derrames evitando su contaminación y que la cantidad de la muestra sea adecuada para poder realizar ambas técnicas.

9.1.2. RECOLECCION DE DATOS CLINICOS

Las muestras que fueron recolectadas incluían un formulario en el cual se indicaba datos clínicos del paciente, que son necesarios para realizar el análisis estadístico.

9.1.3. METODO MICROBIOLOGICO CONVENCIONAL CULTIVO OGAWA

Las muestras fueron procesadas en el Instituto nacional del Tórax en el Laboratorio de cultivo, se tomó la mitad de la muestra y la otra parte fue llevada al SELADIS para realizar el ensayo MODS, ambos métodos fueron realizados el mismo día.

9.1.3.1. PROCEDIMIENTO

- Registrar la muestra en el cuaderno de cultivo.
- Identificar la muestra con el número respectivo.
- Colocar el envase que contiene la muestra en una bandeja cubierta con papel humedecido con hipoclorito de sodio al 1%.
- Ubicar el mechero entre el operador y la muestra a procesar
- Abrir el envase. Elegir y recolectar con el hisopo las partículas útiles del líquido adhiriéndolas al hisopo estéril. Cerrar el envase.
- Sumergir el hisopo en un tubo ependorf con solución de NaOH 4% estéril durante 2 minutos. (Para muestras contaminadas)

- Retirar el hisopo, sin escurrir, y sembrar con el mismo hisopo al medio de Ogawa acidificado, con movimientos de rotación y presión flameando el borde superior del tubo antes y después de la siembra. Repetir el procedimiento con los dos tubos restantes.
- Descartar el hisopo en un recipiente que contenga hipoclorito de sodio al 1% eliminar según normas de acuerdo a las circunstancias de cada servicio.

Luego de sembrar la muestra colocar los tubos inclinados en la estufa a 37°C con la tapa semiabierta durante 48 a 72 hrs, verificando que los tubos de cultivos presenten las características físico químicas del medio de cultivo y observando si existiera el crecimiento de otro tipo de flora bacteriana u hongos que generalmente licuan el medio de cultivo.

Después de las 72 horas de control de contaminación colocar los tubos sin contaminación en posición vertical en la gradilla con la tapa ajustada en la estufa. Realizar las lecturas de todos los tubos sembrados cada semana para verificar si existen contaminaciones posteriores ó desarrollo de Micobacterias de crecimiento rápido.

9.1.4. METODO MODS

9.1.4.1. CONSIDERACIONES GENERALES PARA LAS MUESTRAS

Las muestras de fluidos son tomadas de una zona afectada y normalmente estéril.

Las muestras son colectadas en una variedad de recipientes estériles sin preservantes.

La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio para su proceso.

La muestra puede ser preservada en refrigeración a 2-8°C de preferencia por no más de 24 horas.

9.1.4.2. PROCEDIMIENTO

La muestra es concentrada por centrifugación a 3000g por 15 minutos. Luego de la centrifugación el sobrenadante es decantado cuidadosamente y el sedimento es re

suspendido en un volumen total de 2ml del medio 7H9-OADC-PANTA (del tubo que contiene 5.1ml de 7H9-OADC-PANTA) en el tubo de centrifuga con una pipeta Pasteur; mezclar bien. Adicionar la suspensión de la muestra al tubo que contiene el remanente del medio 7H9-OADC-PANTA; mezclar bien. Esta es la suspensión final de la muestra lista para dispensarse en la placa.

Si se sospecha que la muestra líquida está ligeramente contaminada y esta probablemente se contamine, esta debe ser procesada por inoculación directa en el medio 7H9-OADC con 2X de PANTA, sin embargo si la muestra está completamente contaminada se procederá a decontaminarla.

Preparación de controles positivos

Los controles positivos fueron otorgados por el Laboratorio de cultivo (Tórax), se utilizaron cepas sensibles, monorresistentes y multidrogorresistentes. Las colonias fueron procesadas en un tubo de TB Diluting Fluid que contiene perlas para diluir las colonias con la ayuda de un vortex, se agregó este contenido a otro tubo que contenía agua y Tween, ajustando a una turbidez estándar de McFarland de látex N°1 (3×10^6 UFC/ml), se agregó 5ul de esta suspensión a frascos que contiene caldo base Middlebrook 7H9. (Anexo 2)

Preparación de las soluciones antibióticas

Se reconstituyeron los antibióticos cada uno en un frasco que contenía agua desionizada, se utilizaron tres frascos uno con Isoniacida, otro con Rifampicina y por ultimo con PANTA. (Anexo 3)

Preparación final de la placa de MODS (detección)

Dispensar 1ml de la suspensión final de la muestra en cada uno de los 4 pozos en una sola columna de la placa de 24 pozos. Almacenar un alícuota stock de la suspensión de la

muestra remanente (1.1ml) en un tubo estéril de microcentrífuga a 2-8°C como back up. Repetir el mismo procedimiento con las otras muestras hasta que todas las columnas de la placa estén llenas con excepción de la columna 3 (o hasta que todas las muestras hayan sido dispensadas). Dispensar 1ml del medio 7H9-OADC-PANTA **sin muestra** en los 4 pozos de la columna 3 de cada placa de MODS (controles internos negativos). Cerrar la placa con su tapa, colocarla en una bolsa de polietileno tipo ziploc y cerrarla. (La bolsa no se abrirá de ahora en adelante). Incubar a 37°C (No es necesario el enriquecimiento con CO₂). (Anexo 4)

Si el proceso de la muestra es directa o por decontaminación, la muestra decontaminada y la muestra directa debe ser inoculada en columnas separadas (4 pozos para cada muestra) y puede ser dispensada en la misma placa.

Lectura de las placas e interpretación

Luego de 5 días de haber realizado la siembra, se realizó la lectura de las placas con un microscopio de luz invertida, cada día se observaba el si existía crecimiento del *M. tuberculosis*, con la aparición de los cordones o comas característicos de este microorganismo, se observaron los 4 pozos de la muestra, del control positivo y del control negativo. Un resultado positivo es definido como el crecimiento de dos o más unidades formadoras de colonia ($\geq 2\text{ufc}$) en uno o más pozos.

9.2. TIPO O DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio descriptivo correlacional aplicando herramientas de test diagnóstico.

9.3. SITIO O CONTEXTO DEL ESTUDIO

El presente estudio se llevará a cabo en los Laboratorios de referencia departamental del Hospital del TORAX (componente microbiológico) y en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS pruebas (MODS)

9.4. UNIVERSO Y POBLACIÓN O MUESTRA

Universo: Se trabajará con muestras provenientes de pacientes con sospecha de TB extrapulmonar, derivadas al laboratorio de REFERENCIA DEPARTAMENTAL DEL TORAX.

Muestras: líquidos estériles

Criterios de inclusión

Muestras de líquidos estériles, provenientes de pacientes con sospecha de tuberculosis extrapulmonar.

Criterios exclusión

Pacientes que no cuenten con registros de datos demográficos

Muestras contaminadas con otras bacterias

Muestras sanguinolentas

Muestras mal almacenadas.

Muestras con más de 48 horas de almacenamiento

9.5 TAMAÑO DE MUESTRA

El tipo de muestreo será por conveniencia. Por la casuística y tipo de diseño del estudio este se llevará a cabo en 50 muestras de líquidos estériles.

9.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicarán parámetros estadísticos de test diagnóstico

Coeficiente de correlación kappa

Estadística descriptiva

9.7 ASPECTOS BIOÉTICOS

Anexo 5

10. RESULTADOS

10.1 IDENTIFICACION DEL *M. tuberculosis* MEDIANTE METODO MICROBIOLOGICO OGAWA

Se procesaron 50 muestras extrapulmonares, de las cuales 2 muestras salieron positivas con el cultivo Gold estándar Ogawa. No se observó contaminación de las muestras procesadas. (Grafico 1)

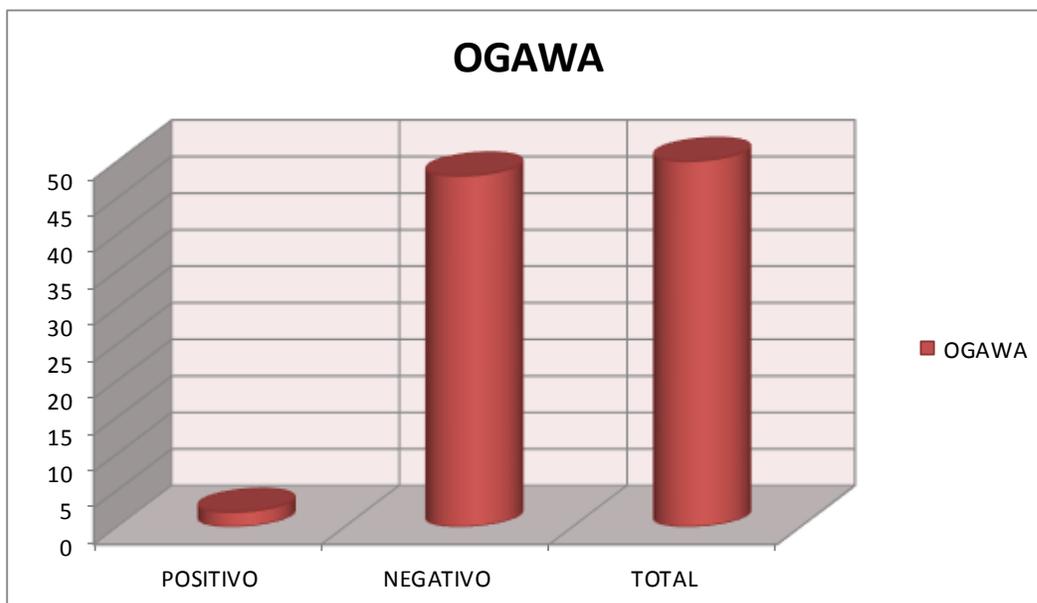


GRAFICO 1. Resultados obtenidos mediante el método Gold estándar cultivo Ogawa, por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis, junio de 2015 a febrero del 2016.

10.2 IDENTIFICACION DEL *M. tuberculosis* MEDIANTE EL MODS

De las 50 muestras procesadas, 3 muestras salieron positivas para el MODS (Anexo 6, 7 Y 8). No se observó contaminación en ninguno de los pozos. (Grafico 2)

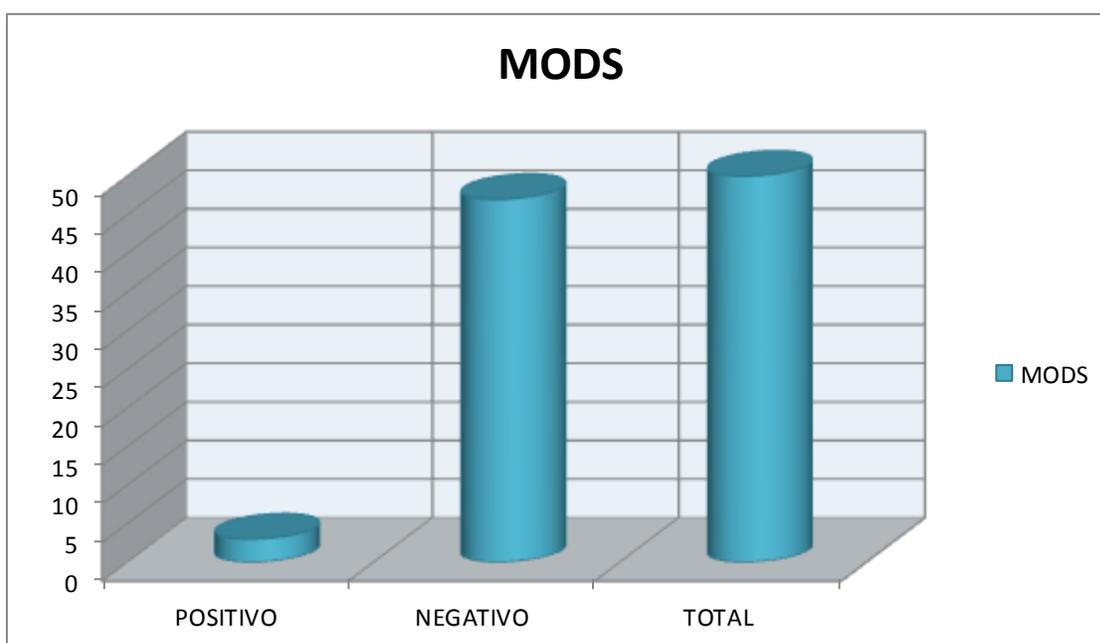


GRAFICO 2. Resultados obtenidos mediante MODS, por el Instituto SELADIS, junio de 2015 a febrero del 2016.

10.3 PERFIL DE SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA SOBRE LAS MUESTRAS POSITIVAS

El perfil de sensibilidad y resistencia del MODS se realiza con dos fármacos de primera línea Isoniacida y Rifampicina. Se observaron las muestras que dieron positivas en MODS, con resultados de las tres muestras como sensibles a ambos fármacos (tabla 1), eso indica que no habrá problemas con el tratamiento para ninguno de los pacientes.

TABLA 1. Resultados sobre el perfil de sensibilidad y resistencia de las muestras que salieron positivas. Instituto SELADIS, junio de 2015 a febrero del 2016

MUESTRAS	MODS	
	ISONIACIDA	RIFAMPICINA
Líquido Pleural	Sensible	Sensible
Líquido Pleural	Sensible	Sensible
Líquido Ascítico	Sensible	Sensible

10.4 CONCORDANCIA DEL ENSAYO MODS CON EL METODO OGAWA

Se vio que dos de las muestras que dieron positivas fueron por ambos métodos MODS y Ogawa, una muestra fue positiva por el método MODS pero no por el Ogawa. Observando los resultados de ambos métodos basados en la detección del *M. tuberculosis*, se calculó el grado en que el método Ogawa coincidió con el ensayo MODS, aplicando el índice de concordancia kappa mediante el cual se obtuvieron los siguientes resultados. Se realizó una tabla de contingencia con los resultados que se obtuvieron del MODS y Ogawa (tabla 2)

TABLA 2. Distribución de muestras positivas y negativas mediante MODS y el cultivo gold standar Ogawa, a través de una tabla de contingencia. Instituto SELADIS, junio de 2015 a febrero del 2016

		OGAWA		TOTAL
		Positivo	Negativo	
MODS	Positivo	2	1	3
	Negativo	0	47	47
TOTAL		2	48	50

Obteniendo un Chi -cuadrado de 32,638 (valor $P < 0.05$). Lo cual nos indica una dependencia entre los resultados obtenidos por lo cual podemos realizar el análisis de

concordancia. Se determinó la concordancia entre el ensayo MODS y el método Ogawa dando como resultado una concordancia observada de 0,98, una concordancia esperada de 0,9048 y un valor kappa de 0,8. Según los criterios de Landis y Koch, el valor kappa obtenido corresponde a un grado de concordancia Buena entre el ensayo MODS y el método Ogawa (tabla 3)

TABLA 3. Valoración de la concordancia entre MODS y el cultivo Gold standar Ogawa aplicando el índice kappa. Instituto SELADIS, junio de 2015 a febrero del 2016

Concordancia observada	0,98
Concordancia esperada	0,9048
Valor kappa	0,8
Grado de concordancia	Buena

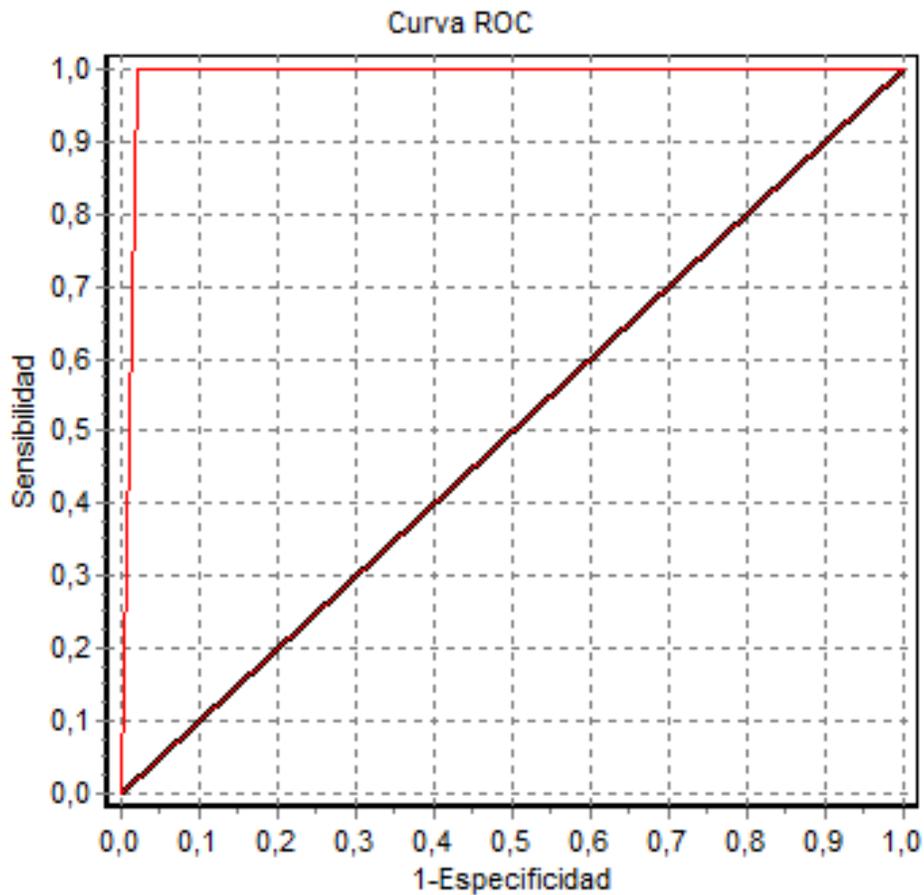
10.5 SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DEL MODS FRENTE AL OGAWA

A partir de los datos observados en la tabla de contingencia, el ensayo MODS obtuvo una especificidad de 0,98 (98%), una sensibilidad de 0,1 (100%), un valor predictivo positivo del 67% y un valor predictivo negativo de 100%. (Tabla 4)

TABLA 4. Tasas de evaluación del MODS frente al cultivo Gold standar Ogawa. Instituto SELADIS, junio de 2015 a febrero del 2016

TASAS	MODS
SENSIBILIDAD	100%
ESPECIFICIDAD	98%
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	67%
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	100%

Se realizó la relación entre la prueba MODS y el cultivo Ogawa, con la curva ROC o curva de rendimiento diagnóstico con un nivel de confianza del 95% se obtuvo un área bajo la curva ROC (AUC) de 0,9896. Lo que indica que existe un 98% de probabilidad de que el ensayo MODS detecte correctamente a las personas con Tuberculosis Extrapulmonar (grafica 3)



GRAFICA 3. Relación entre el MODS y el cultivo Gold standar Ogawa, mediante la curva ROC. Instituto SELADIS, junio de 2015 a febrero del 2016

Todos los datos fueron obtenidos con el programa EPIDAT.

10.6 TIEMPO DE DETECCION DEL CRECIMIENTO DE *M. tuberculosis* EN MODS Y EN CULTIVO OGAWA

El tiempo para la detección del *M. tuberculosis*, se realizó desde la inoculación de las muestras al medio de cultivo, realizando ambos métodos al mismo tiempo. Se observó que el ensayo MODS presenta un tiempo de detección del bacilo en menos tiempo que el cultivo Ogawa, pudiendo así obtener a partir del MODS resultados desde el día 11, (tabla 5)

TABLA 5. Diferencia entre el MODS y el cultivo gold standar Ogawa sobre el tiempo de detección Instituto SELADIS, junio de 2015 a febrero del 2016

MUESTRAS	TIEMPO DE DETECCION (DIAS)	
	MODS	OGAWA
Liquido Pleural	11	40
Liquido Pleural	15	40
Liquido Ascítico	15	0

11. DICUSION

La tuberculosis extrapulmonar es una enfermedad que en la actualidad sigue siendo causa de sospecha en el diagnóstico rutinario en varios hospitales, esta se presenta en pacientes que tuvieron tuberculosis pulmonar, la cual es mas prevalente en ciudades de bajos recursos, con poblaciones que sufren desnutrición y pobreza, aunque se ha visto que

en países con una economía estable sufren esta enfermedad debido a la mala alimentación por parte de la población, una persona gorda puede estar mal nutrida o hasta tener anemia.

En nuestro país Bolivia donde aun la situación económica afecta a la población haciéndola esta ser de clase social baja lo que conlleva a una población mal nutrida y ser sensible a padecer esta enfermedad. La tuberculosis extrapulmonar no es contagiosa pero el diagnostico de esta suele ser tardío, debido a la dificultad de relacionar los síntomas con esta enfermedad.

En Bolivia según la OMS el año 2014 se reportaron 6622 casos nuevos de Tuberculosis extrapulmonar colocándolo en el cuarto puesto.

Existen varios factores para que esta enfermedad se presente, los pacientes que tuvieron TB pulmonar abandonaron el tratamiento, sufrieron una coinfección o una recaída. Ya sea cualquiera de estos motivos para presentar la enfermedad, esta puede llegar a grandes complicaciones así como la tuberculosis meníngea, ya que el bacilo se puede alojar en cualquier parte del cuerpo.

Los pacientes que abandonaron el tratamiento, por diversas razones siguen presentando la enfermedad de la tuberculosis y esta puede llegar a provocar una tuberculosis extrapulmonar y también cepas resistentes a fármacos.

La co-infección tuberculosis/VIH es uno de los problemas de salud más importantes que afronta la humanidad. El VIH incrementa el riesgo de enfermarse de TB y la TB acelera el curso del VIH/Sida. En nuestra ciudad La Paz, SEDES informo que existen 3395 pacientes, de los cuales; 2630 son portadores del virus y 765 de SIDA. En los pacientes que tuvieron tuberculosis y sanaron pero se infectan con el virus del SIDA es probable que

estos presente otra vez tuberculosis pulmonar y que además se presente también la forma extrapulmonar en los resultados se dio uno de estos casos en la muestra de líquido pleural.

Se define que existe recaída por tuberculosis (TB) cuando un paciente que ha sido declarado como curado de la enfermedad, regresa al servicio de salud con examen directo o cultivo positivo, o ambos. Esto puede deberse a la presencia de bacilos resistentes a los antituberculosos, de manera que si un paciente presenta otra vez la enfermedad puede extenderse a una tuberculosis extrapulmonar.

El Cultivo es el único método que asegura un diagnóstico de certeza de tuberculosis y ofrece una mayor capacidad diagnóstica que la baciloscopia pero tiene sus limitaciones por el costo y la demora en los resultados (aproximadamente 6 a 8 semanas) (Arturo, Heidy, & Dory, 2015). En Bolivia el único cultivo que se utiliza para el diagnóstico de Tuberculosis Extrapulmonar es el Ogawa, así también para las pruebas de sensibilidad y resistencia esto se ha determinado por el Programa Nacional de Control de Tuberculosis, recientemente en el año 2015.

Observando los resultados, se procesaron 50 muestras de líquidos estériles, mediante el cultivo Ogawa se obtuvieron dos muestras positivas, ambas fueron líquido pleural, el Ogawa es el gold estándar por su alta sensibilidad que le permite detectar un mínimo de 10 a 100 bacilos por mililitro de muestra si es realizado cumpliendo las normas, además permite estudiar los bacilos vivos por técnicas de identificación. (Laboratorio Nacional de referencia de TB, 2012)

En MODS se obtuvieron tres muestras positivas de las 50 muestras procesadas, dos fueron de líquido pleural y una de líquido ascítico, aun no existen muchos trabajos realizados con MODS en muestras de líquidos estériles, en cambio sí se sabe que en

medios líquidos tiene una mayor sensibilidad. (Cheng, 1994). Y este método se está implementando en varios países aparte de Perú.

La muestra del líquido ascítico que dio positivo en MODS pero negativo en Ogawa, pudo ser debido al tiempo de descontaminación de la muestra que se realiza con hidróxido de sodio. En estos casos las muestras que son decontaminadas en un tiempo prolongado a lo habitual, ocasionaría una disminución en la carga bacilar de la muestra o en su total eliminación.

En un primer periodo, se trabajó con medios de cultivo caducados debido a un retraso en la llegada de nuevos cultivos para el desarrollo de este trabajo, y se observó que en una muestra de LCR a los 21 días de lectura dio negativo en MODS y positivo en Ogawa a los 60 días de lectura. Cabe resaltar que el paciente presentó una co-infección con VIH, por la tardanza de crecimiento a los 60 días y con 4 colonias, el paciente ya pudo estar en tratamiento, entonces los bacilos ya estarían afectados para poderse desarrollar.

Así mismo el medio caduco del ensayo MODS no se encontraba en condiciones muy aptas para detectar al bacilo ya que cuando un medio pasa de su fecha de vencimiento existen cambios en su composición o propiedades. Lo que lo hace un medio con alta sensibilidad.

Otro motivo puede ser el tiempo prolongado desde la llegada de la muestra hasta proceder a realizar la siembra al cultivo, ya que si la muestra presenta otros microorganismos aparte del *M. tuberculosis* estos pueden contaminar la muestra a tal punto que no sea posible recuperar a los bacilos sin que se contaminen los medios de cultivo y no facilitar su detección.

A parte de detectar al bacilo el ensayo MODS nos permite realizar la prueba de sensibilidad y resistencia hacia los fármacos de primera línea Isoniacida y Rifampicina, en los resultados se observan sensibilidad a ambos fármacos en las tres muestras que se detectó al bacilo. Esta prueba nos permite detectar cepas multidrogorresistentes, aunque en la biografía no se encontraron varias referencias sobre cepas drogorresistentes en muestras extrapulmonares, tiene una gran importancia en el tratamiento que recibirá el paciente.

En sospecha de la tuberculosis extrapulmonar el doctor inicia el tratamiento sin depender siempre del resultado del cultivo, esto puede traer algunas contraindicaciones que pueden causar los fármacos antituberculosos en caso de que los pacientes no padezcan esta enfermedad, por ejemplo aumentos transitorios de las transaminasas durante el tratamiento con isoniazida y en raras ocasiones se han comunicado casos de hiperbilirrubinuria, ictericia y hepatitis.

Por lo tanto la isoniazida está contraindicada en pacientes con enfermedad hepática aguda y deberá administrarse con precaución a pacientes con alguna enfermedad hepática crónica (alcoholismo, cirrosis o hepatitis crónica). Los pacientes de más de 50 años de edad son más propensos a desarrollar hepatitis, y el riesgo de padecer esta reacción adversa es cuatro veces mayor los pacientes que consumen alcohol diariamente. La isoniazida debe ser usada con precaución en los pacientes con insuficiencia renal dado que la eliminación del fármaco puede prolongarse aumentando la posibilidad de reacciones adversas.

La isoniazida puede ocasionar neuropatía periférica debido a una intolerancia a este fármaco sustancia. Los pacientes con diabetes melitus, malnutrición o alcoholismo están más predispuestos a experimentar esta complicación. La isoniazida también empeora

cualquier neuropatía periférica preexistente, especialmente en pacientes infectados por el HIV. Se recomienda administrar un suplemento de piridoxina para evitar o aliviar esta complicación, recomendación especialmente importante en el caso de pacientes epilépticos. (ANMAT, 2012)

Para el tratamiento con Rifampicina, deben realizarse exámenes basales de enzimas hepáticas, bilirrubina, creatinina sérica, examen sanguíneo completo y cuenta plaquetaria antes de iniciar el tratamiento y durante este cada 2 a 4 semanas. Los exámenes basales son innecesarios en niños a menos que se conozca o sospeche clínicamente de algún padecimiento subyacente. La Rifampicina tiene propiedades inductoras enzimáticas que pueden aumentar el metabolismo de sustratos endógenos, incluyendo hormonas (adrenal, tiroidea) y vitamina D. Reportes aislados han asociado una exacerbación de la porfiria con la administración de Rifampicina como resultado de la inducción de la sintetasa del ácido delta aminolevulínico. (Catálogo, 2005)

Estos efectos de los fármacos hacen que el paciente no logre completar el tratamiento debido a que no lo tolera por ciertas complicaciones que se puedan dar y en casos de que el paciente no tenga tuberculosis extrapulmonar puede todavía empeorar la situación de algunos pacientes, y si se encontraran cepas resistentes a los fármacos el tratamiento es otro, y la temprana detección de cepas drogorresistentes nos permite realizar un tratamiento efectivo para el paciente. El tratamiento de la tuberculosis extrapulmonar requiere atención por parte del servicio de salud como del paciente.

Se determinó el grado de concordancia entre Ogawa y MODS dando como resultado una concordancia observada de 0,98, una concordancia esperada de 0,9048y un

valor kappa de 0.8. Comúnmente, se requiere un valor de kappa de por lo menos 0.70, pero se prefieren valores de kappa cercanos a 0.90, en los resultados se observó un valor kappa de 0.8 calificado como "Buena", nos indica que la evaluación entre Ogawa y MODS obtuvo un buen grado de concordancia.

El cultivo es una técnica que tiene mayor sensibilidad (70-90%). El aislamiento de las micobacterias por cultivo es entorpecido por su lento crecimiento. Un promedio de incubación de 4 semanas en medios convencionales se requiere antes que pueda ser detectado crecimiento. De tal manera que en casos en los que se requiera una toma de decisiones rápidas para instaurar una terapéutica efectiva su valor es muy limitado.

Observando los resultados el MODS tiene una sensibilidad del 100% mucho más alta que el Ogawa, una especificidad del 98%, un valor predictivo negativo de 100% y un valor predictivo positivo de 67%, observando el valor predictivo positivo es bajo, ya que está relacionado con la prevalencia de la enfermedad, a medida que la prevalencia de la enfermedad sube el VPP aumenta pero el VPN va disminuyendo. Por lo tanto, si la prevalencia es alta, un resultado positivo tiende a confirmar la presencia de la enfermedad, mientras que si la prevalencia es baja, un resultado positivo no permitirá afirmar su existencia. (Pita Fernández, 2010)

Se realizó también un análisis mediante la curva ROC, la cual nos permite conocer el rendimiento global de una prueba, comparar pruebas y elegir el punto de corte apropiado para cada paciente. En los resultados se observó el análisis de la curva ROC entre la prueba MODS y el cultivo Ogawa, se obtuvo un nivel de confianza del 95%, un área bajo la curva ROC (AUC) de 0,9896, casi cercano a 1 (casi perfecto). Lo que indica que existe un 98%

de probabilidad de que el ensayo MODS detecte correctamente a las personas con Tuberculosis Extrapulmonar.

La curva ROC constituye un método estadístico para determinar la exactitud diagnóstica de tests, siendo utilizadas con tres propósitos específicos: determinar el punto de corte de una escala continua en el que se alcanza la sensibilidad y especificidad más alta, evaluar la capacidad discriminativa del test diagnóstico, es decir, su capacidad de diferenciar sujetos sanos versus enfermos, y comparar la capacidad discriminativa de dos o más tests diagnósticos. (Cerdeira & Cifuentes, 2011)

Sobre las dos muestras de líquido pleural que dieron positivo en MODS y en Ogawa, se observa en los resultados la diferencia del tiempo de detección del *M. tuberculosis*, en MODS se detectó una muestra al día 11 y la otra al día 15. En Ogawa ambas muestras se detectaron al día 40, esto nos da a saber la rapidez de detección del MODS, esto se debe a que en un medio líquido el bacilo aumenta su viabilidad por lo que crece con mayor rapidez

Una confirmación temprana de la presencia del bacilo ayuda a la pronta mejora del paciente que puede estar en condiciones avanzadas o en principios de esta enfermedad. Ya que si no está cursando por una tuberculosis extrapulmonar puede estar afectado por otra enfermedad grave y no estar recibiendo el tratamiento adecuado. Así logrando la disminución de la prevalencia de esta enfermedad en nuestro medio

12. CONCLUSIONES

Al observar los resultados del presente trabajo podemos determinar que el ensayo de susceptibilidad a fármacos antituberculosos mediante observación microscópica (MODS),

sirve como herramienta alterna para el diagnóstico de Tuberculosis Extrapulmonar, en muestras de líquidos estériles.

Se logró identificar cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de líquidos estériles mediante métodos microbiológicos cultivo Ogawa, observándose el crecimiento característico de las colonias en este medio.

Se logró identificar cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras extrapulmonares mediante métodos microbiológicos, por sus características de crecimiento como la formación de cordones en MODS.

Se logró detectar cepas resistentes a los fármacos Isoniacida y Rifampicina (MDR-TB), mediante el método MODS, en tal caso que se vio que las tres muestras positivas resultaron sensibles a ambos fármacos.

Se logro determinar los valores de concordancia entre el MODS y el cultivo microbiológico convencional Ogawa con un valor kappa de 0,8 indicando un grado de concordancia buena.

Se hallaron los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de MODS frente al cultivo Ogawa. La sensibilidad del MODS logro ser más alta que el Ogawa debido a varias características de este.

El cultivo Ogawa nos puede proporcionar resultados a partir del día 11 en el caso de muestras de líquidos estériles, como se observan en los resultados el cultivo Ogawa dio resultados de positividad en el día 40, esto es de gran aportación en el diagnóstico que suele ser tardío con el Ogawa.

Finalmente se comparó la detección de *M. tuberculosis* en medio de cultivo Ogawa (método convencional) y en MODS. Observando los resultados obtenidos el MODS detecto

al bacilo en una muestra de líquido ascítico, esta única muestra influye en la capacidad de detectar la enfermedad, un paciente hace la diferencia y demuestra que el ensayo MODS es considerado como un método alternativo para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar, así aceptando nuestra hipótesis.

BIBLIOGRAFIA

Aguirre, J. M. (2006). Infección por micobacterias del sistema nervioso central. Mexico: Bol. Med. Hosp. Infant.

Aguirre, J. M. (2006). Infección por micobacterias del sistema nervioso central. Mexico: Bol. Med. Hosp. Infant.

ANMAT. (2 de febrero de 2012). Vademecum. Recuperado el 12 de enero de 2017, de <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/i023.htm>

Arturo Hechavarria, G. M. (2014). Pericarditis Tuberculosa con derrame pleural. Revista Médica de Costa Rica, 1.

Asencios, L., Margoth, A., & all, e. (2011). SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS DE Mycobacterium tuberculosis MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA. Lima: Ministerio de salud Peru.

Arturo, A., Heidy, A., & Dory, A. (2015). MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN TUBERCULOSIS; LO CONVENCIONAL Y LOS AVANCES TECNOLÓGICOS EN EL SIGLO XXI. Revista Medica La Paz, 3.

Biobacter (2015). Medio Ogawa Kudoh.

Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables. (junio de 2005). FACMED. Recuperado el 14 de enero de 2017, de http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/149.HTM

Cheng AF, Li MS, Chan CY, Lyon D, Wise R, Lee JC. Evaluation fo three culture media and their combination for the isolation of Mycobacterium tuberculosis from pleural aspirates of patients with tuberculous pleurisy. J Trop Med Hyg 1994; 97:249-53.

CECMED. (2015). Resumen de las características del producto. Cuba.

DEPA.FQUIM. (7 de diciembre de 2015). Obtenido de www.depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/APUN-Mycobacterium.pdf

Doc Player. (7 de enero de 2016). Doc player. Obtenido de www.docplayer.es/8026258-Tema-9-tuberculosis-pleuropulmonar.html

Doc Player. (s.f.). Recuperado el 22 de agosto de 2015, de <http://docplayer.es/15417073-Guia-de-atencion-integral-de-la-tuberculosis-pulmonar-y-extrapulmonar.html>

Dra. Valeria Yesica Stangalino, D. J. (2012). Tuberculosis extrapulmonar otra cara de la misma moneda. INTRAMED JOURNAL, 2.

Enfermería tipos de TB. (3 de marzo de 2016). Obtenido de WIX:
<http://hsbtbsabana.wixsite.com/enfermeria/fragrance>

FCQ. (22 de enero de 2016). Obtenido de
http://www.fcq.uach.mx/phocadownload/DOCENCIA/MATERIAL-DE-ESTUDIO/micobacterias/biologia/biologia_de_las_micobacterias.html

Gastón, A. I. (2015). Estudio comparativo de la tuberculosis en España y Bolivia. Propuesta de intervención de enfermería. UPNA, 5.

Jorge Martín Llaca Díaz, A. F. (2003). LA BACILOSCOPIA Y EL CULTIVO EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR. Revista Salud Publica y Nutricion RSPYN, 1.

Laboratorio Nacional de referencia de tuberculosis. (2012). Manual de procedimientos Tecnicos para cultivo de micobacterias de la red nacional de laboratorios de TB. La Paz.

Lapausa, R., Saldaña, M., & Asensio, N. (2015). Tuberculosis extrapulmonar, una revisión. Rev Esp Sanid Penit, 3-11.

Luis, A., Margoth, A., & all, e. (2011). Susceptibilidad a drogas de Mycobacterium tuberculosis mediante observacion microscopica MODS. Lima: Ministerio de salud Peru.

M Ramírez-Lapausa, A. M.-S.-A. (2015). Tuberculosis extrapulmonar, una revision. Revista Española Sanid Penit, 3.

Medicine.ufl. (n.d.). Retrieved agosto 9, 2015, from
sntc.medicine.ufl.edu/Files/drtbspanish/documents/05SituacionesEsp.pdf

Ministerio, S. d. (2009). Manual de Normas Tecnicas en TB. 49-63.

Ministerio de Salud. (2015). BOLETIN INFORMATIVO. La Paz: Edicion general Ministerio de Salud Programa Nacional de Control de Tuberculosis.

MODS PERU. (2008). Retrieved agosto 5, 2015, from
www.modsperu.org/sops/PNO_LCR_v5_Nov_2008

MODS PERU. (2008). Retrieved agosto 5, 2015, from
www.modsperu.org/sops/PNO_otros_fluidos_v5_Nov_2008

Palacin, S. (1994). Tuberculosis. In M. Hernandez, *Enfermedades Infecciosas* (pp. 1188-1192). Madrid: Edigrafos.

Oscar Alejandro Farías Llamas, M. K. (2005). Tuberculosis peritoneal e intestinal. *Revista Gastroenterología*, 1.

Ortiz, E., & Bejar, F. (octubre de 2012). libroslaboratorio.files.wordpress.com. Recuperado el 8 de abril de 2015, de www.libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/10/microbiologc3ada_-tipos-y-pruebas-de-laboratorio.pdf

Parimango, D., Chavez, M., & all, e. (2007). Comparación de los medios Ogawa y Löwenstein-Jensen en el aislamiento de Mycobacterium tuberculosis de pacientes con tuberculosis pulmonar. Hospital Regional Docente de Trujillo, Peru. *Revista Medica Vallejana*, 24-31.

Peru, M. d. (2011). SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS de Mycobacterium Tuberculosis MEDIANTE OBSERVACION MICROSCOPICA (MODS). Lima.

Republica, U. d. (2006). Temas de Bacteriología y Virología Medica. Fefmur.

Rodriguez. (2002). Mycobacterias. En TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA (pág. 381).

Suarez, I. (5 de 12 de 2015). UVS Fajardo. Obtenido de <http://uvsfajardo.sld.cu/tuberculosis-pulmonar-y-localizaciones-extrapulmonares>

Trabajo, I. N. (2012). Mycobacterium tuberculosis. Databio, 4

Vademecum. (s.f.). TQFARMA. Recuperado el 21 de diciembre de 2016, de <https://www.tqfarma.com/productos/vademecum-mk/antiinfecciosos-sistemicos-generales/rifampicina-mk>

WHO. Tuberculosis report 2014:. (n.d.). Retrieved 2015, from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf?ua=1.

ANEXOS

ANEXO1.- MICROSCOPIO DE LUZ INVERTIDA



ANEXO 2.- MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MUESTRA, CONTROL POSITIVO, CONTROL NEGATIVO Y DE DILUCION.



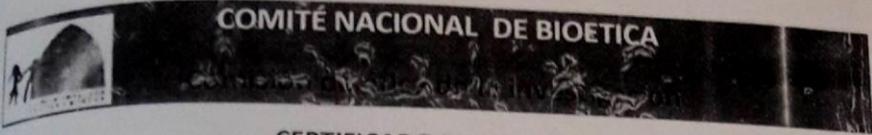
ANEXO 3.- ANTIBIOTICOS USADOS RIFAMPICINA, ISONIACIDA Y PANTA



ANEXO 4.- INCUBACION DE LAS PLACAS MODS



ANEXO 5.- AVAL ETICO



CERTIFICADO DE AVAL ÉTICO

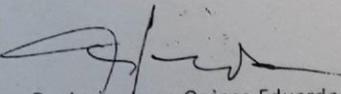
A quien corresponda:

La Comisión de Ética de la Investigación del Comité Nacional de Bioética (CEI-CNB), tiene a bien informar que fue presentado a la CEI-CNB, para su revisión y aval ético el proyecto "Validación del MODS (*Microscopic Observation Drug Susceptibility*) para el diagnóstico de la Tuberculosis en La Paz, Bolivia", por el Instituto SELADIS (Servicios de Laboratorio, Diagnóstico e Investigación en Salud) / Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA).

Dicho proyecto fue evaluado bajo la normativa internacional, que indica los criterios éticos que se toman en cuenta para todo proyecto de investigación que involucra seres humanos:

1. Validez científica (diseño metodológico bien formulado)
2. Selección equitativa de la muestra (tomando en cuenta principalmente a grupos vulnerables)
3. Validez social (pertinencia, atinencia y relevancia del proyecto)
4. Relación Riesgo/Beneficio (viendo que el riesgo sea mínimo y mayor el beneficio para los sujetos de estudio)
5. El Consentimiento Informado (documento redactado de una manera clara, comprensible y lo suficientemente informativo para el sujeto de investigación)

Una vez verificadas las correcciones hechas por el Investigador Principal, en base a las observaciones de la CEI, es que se tiene a bien certificar que el mencionado proyecto cumple con todos los requisitos éticos arriba mencionados, por lo que los miembros de la CEI-CNB dan el respectivo AVAL ÉTICO al proyecto "Validación del MODS (*Microscopic Observation Drug Susceptibility*) para el diagnóstico de la Tuberculosis en La Paz, Bolivia", el mismo que puede proseguir con su ejecución.


Dr. Javier Luna Orósco Eduardo
COORDINADOR
Comité Nacional de Bioética

La Paz, 13 de Agosto 2013

ANEXO 6.- MUESTRA POSITIVA DE LIQUIDO ASCITICO A LOS 20 DIAS



ANEXO 7.- MUESTRA DE LIQUIDO PLEURAL A LOS 20 DIAS



ANEXO 8.- SEGUNDA MUESTRA DE LIQUIDO PLEURAL A LOS 20 DIAS

