

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)



ESTUDIO COMPARATIVO DEL ENSAYO MODS
(*Susceptibilidad a fármacos mediante observación microscópica*),
CON TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS CONVENCIONALES,
PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR,
EN LA PAZ BOLIVIA

Tesis de Grado para obtener el Título de Licenciatura en Bioquímica
POR: Univ. SANDRA PARISACA MAMANI
TUTORA: Dra. ANETH VASQUEZ MICHEL

LA PAZ-BOLIVIA
Diciembre, 2013

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

Tesis de grado:

ESTUDIO COMPARATIVO DEL ENSAYO MODS (Susceptibilidad a fármacos mediante observación microscópica), CON TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS CONVENCIONALES, PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS PULMONAR, EN LA PAZ BOLIVIA

Presentada por: Univ. Sandra Parisaca Mamani

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 Vasquez Michel

Tribunal: Dr. Miguel Estenssoro

Tribunal: Dra. Angela Bautista Quispe

Tribunal: Dra. Orfa Luz Hurita López

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO.

A mis padres; sin su ayuda y constante apoyo es seguro que no estaría donde estoy ni sería lo que soy.

A mis hermanos; por enseñarme que sabiendo afrontar los obstáculos toda meta puede ser alcanzada.

A mi tutora, Dra Aneth Vasquez, sin su ayuda y apoyo no habría realizado todo este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a mi tutora, Dra Aneth Vasquez, por su ayuda, constantes consejos, por guiar mis primeros pasos en este campo y hacia este trabajo, y por darme la oportunidad de desarrollarme en su laboratorio de investigación. Gracias por darme una oportunidad y por creer en mí.

A todo el personal de los diferentes Centros de Salud. Dra. Angela Bautista, Dra. Orfa Luz Hurita, Dra Maxima Velarde, Dr. José Melgarejo, quienes con su apoyo e incondicional ayuda, contribuyeron en la recolección de muestras y datos fundamentales para este trabajo. Esto no hubiese dado frutos sin su apoyo.

A la Universidad Mayor de San Andrés y a todos mis profesores durante la carrera por inculcarme conocimientos y muchos principios.

A todos mis compañeros de clases por todos los momentos compartidos. A todo el personal del Instituto SELADIS por estar conmigo y apoyarme desde el inicio hasta el final de esta aventura. Este trabajo no se hubiese podido realizar sin el financiamiento de la Universidad de Barcelona. Mediante el proyecto: A1/036316/11 TB-UBA-UMSA.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
4. JUSTIFICACIÓN	8
5. HIPÓTESIS	9
5.1. HIPÓTESIS NULA	9
5.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA.....	9
6. OBJETIVOS	10
6.1. OBJETIVO GENERAL	10
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
7. MARCO TEÓRICO	11
7.1. DEFINICIÓN DE TUBERCULOSIS	11
7.2. HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS	11
7.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE M. tuberculosis	14
7.4. TUBERCULOSIS PULMONAR	16
7.4.1. TRANSMISIÓN DE LOS BACIOS TUBERCULOSOS	17
7.4.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	20
7.4.3 FISIOPATOLOGÍA E INMUNIDAD	22
7.5. EPIDEMIOLOGIA	24
7.6. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	29
7.6.1. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA	29

7.6.1.1. PRUEBA DE LA TUBERCULINA.....	29
7.6.1.2. TÉCNICAS IN VITRO DE INTERFERÓN-GAMMA ...	32
7.6.2. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD TUBERCULOSA	33
7.6.2.1. VALORACIÓN CLÍNICA.....	34
7.6.2.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO ...	36
7.6.2.2.1. BACILOSCOPIA	36
7.6.2.2.2. CULTIVO ...	39
7.7. MODS (Susceptibilidad a fármacos mediante observación microscópica) ...	41
7.7.1. ANTECEDENTES DEL MODS	43
7.7.2. CAMPO DE APLICACIÓN	45
7.8. TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS	45
8. FUNDAMENTO DE LOS MÉTODOS.....	48
8.1. FUNDAMENTO DE LA TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN ...	48
8.2. FUNDAMENTO DEL CULTIVO EN MEDIO SOLIDO	48
8.2.1. CULTIVO LOWENSTEIN JENSEN	48
8.2.2. CULTIVO STONEBRINK	50
8.2.3. CULTIVO OGAWA	51
8.3. FUNDAMENTO DEL ENSAYO MODS ...	51
8.4. FUNDAMENTO DE LA DECONTAMINACIÓN PREVIA ...	52
8.5. PRUEBA DE TIPIFICACIÓN ESPECÍFICA: PRUEBA DE NIACINA	53
9. METODOLOGIA ...	55
9.1. FLUJOGRAMA DE ESTUDIO ...	55

9.1.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS...	55
9.1.2. CULTIVO EN MEDIO SOLIDO DE LOS RESPECTIVOS CENTROS DE SALUD	56
9.1.3. DECONTAMINACIÓN DE LAS MUESTRAS ...	56
9.1.4. SIEMBRA EN MEDIO LOWENSTEIN JENSEN COMERCIAL ...	56
9.1.5. TEST DE NIACINA ...	57
9.1.6. TINCIÓN ZIEHL NEELSEN	57
9.1.7. PROCEDIMIENTO MODS	58
9.1.7.1. PREPARACIÓN DE CONTROLES POSITIVOS	58
9.1.7.2. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES ANTIBIOTICAS ...	58
9.1.7.3. SIEMBRA DE PLACAS MODS	59
9.1.7.4. LECTURA DIARIA DE PLACAS	60
9.2. DISEÑO DEL ESTUDIO	60
9.3. CONTEXTO Y LUGAR ...	60
9.3.1. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS	61
9.3.2. TAMAÑO DE MUESTRA ...	61
9.3.3. MUESTRAS EN ESTUDIO	61
9.3.4. RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN ...	61
9.3.5. ANÁLISIS DE LOS DATOS	62
10. RESULTADOS	63
10.1. CONCORDANCIA DEL ENSAYO MODS CON LA BACILOSCOPIA Y EL CULTIVO COMERCIAL ...	63

10.2. SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DEL MODS FRENTE A LA BACILOSCOPIA	65
10.3. SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DEL MODS FRENTE AL CULTIVO EN LOWENSTEIN JENSEN COMERCIAL	66
10.4. CONCORDANCIA ENTRE CULTIVO MICROBIOLÓGICO ESTANDARIZADO POR LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS TUBERCULOSIS Y EL ENSAYO MODS EN MUESTRAS CON BACILOSCOPIA POSITIVA.....	68
10.5. TIEMPO DE DETECCIÓN DEL CRECIMIENTO DE M. tuberculosis EN MODS Y EN CULTIVO LJ COMERCIAL Y EL CULTIVO ESTANDARIZADO POR LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE TUBERCULOSIS.....	69
10.5.1. PROMEDIO DE DÍAS EN LOS CUALES SE OBTUVIERON RESULTADOS POSITIVOS (DESARROLLO DE COLONIAS)	69
10.5.2. PORCENTAJE DE MUESTRAS QUE RESULTARON POSITIVAS EN RELACIÓN A LOS DÍAS DE CRECIMIENTO	69
10.5.3. PORCENTAJE DE MUESTRAS QUE RESULTARON POSITIVAS EN RELACIÓN AL GRADO DE POSITIVIDAD DE LA BACILOSCOPIA Y LOS DÍAS DE CRECIMIENTO	71
11. DISCUSIÓN	75
12. CONCLUSIÓN	91
BIBLIOGRAFÍA	93

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa, producida por el *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Generalmente afecta a los pulmones, aunque también se puede diseminar y afectar a otros órganos de nuestro cuerpo (tuberculosis extrapulmonar).

El año 2012, el Programa Nacional de Control de Tuberculosis en Bolivia (PNCT), reportó 7.811 casos de Tuberculosis en todas sus formas, de los cuales 6.139 son de TB pulmonar. Una de las prioridades en la investigación de TB es generar técnicas diagnósticas de bajo costo y baja complejidad que mejoren la sensibilidad, sean universalizables y aplicables en niveles de atención primaria y secundaria.

El ensayo MODS (Susceptibilidad a Fármacos mediante Observación Microscópica) es una prueba rápida, pero relativamente simple basada en la observación de cordones característicos de *M. tuberculosis* cuando crece en medio líquido, los cuales son visualizados tempranamente mediante el uso de un microscopio luz invertida.

El presente estudio pretende comparar el ensayo MODS con técnicas microbiológicas convencionales, para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, en La Paz Bolivia.

La población en estudio estuvo constituida por pacientes sintomáticos respiratorios (SR) que asistieron al: Instituto Nacional del Torax, Hospital Municipal de Caranavi, Hospital Boliviano Holandes, Hospital de Clínicas, Hospital Corea y Hospital Materno Infantil Los Andes. Se recolectó una muestra de esputo por paciente, a las cuales se les realizó baciloscopia, y cultivo en el caso de muestras con baciloscopia positiva, en sus respectivos centros de salud; estas muestras fueron descontaminadas con TB Base Digestant Red. Posteriormente fueron sembradas en medio Lowenstein Jensen comercial y en medios Middlebrook 7H9.

De las 150 muestras recolectadas 75 muestras fueron baciloscopia positiva y 75 fueron baciloscopia negativa. Al comparar al ensayo MODS con la baciloscopia y el cultivo Lowenstein Jensen comercial, se obtuvo una fuerza de concordancia casi perfecta. Comparando al ensayo MODS con la baciloscopia, MODS se obtuvo una sensibilidad 96% y una especificidad de 93%. Utilizando el cultivo Lowenstein Jensen comercial como prueba de referencia, MODS obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100%. En la verificación de la concordancia entre el ensayo MODS y el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Tuberculosis, se obtuvo una fuerza de concordancia casi perfecta.

El tiempo promedio transcurrido para la disponibilidad de resultados positivos en MODS fue de 6 días. En el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Tuberculosis fue de 34 días y en el cultivo Lowenstein Jensen comercial el promedio fue de 23 días.

El ensayo MODS supera a los métodos microbiológicos convencionales utilizados en nuestro país; ya que este fue capaz de detectar al *M. tuberculosis* en muestras de esputo con una alta sensibilidad, especificidad y sobre todo mayor rapidez con una inversión económica y tecnológica reducida

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, MODS, tuberculosis, medio Lowenstein Jensen, baciloscopia.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a contagious disease caused by the Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis) . It usually affects the lungs, although You can also spread and affect other organs of our body (tuberculosis extrapulmonary)

The year 2012 , the National Tuberculosis Control Program in Bolivia (NTP) reported 7,811 cases of tuberculosis in all its forms , of which 6,139 ~~are from~~ TB pulmonar. Una priorities in TB research is to generate diagnostic techniques for low cost and low complexity to improve the sensitivity , are universalized and applicable standards of care primary and secondary.

MODS (Microscopic Susceptibility Drugs by Observation) is a rapid, but relatively simple based on the observation of strands characteristic of M. tuberculosis when grown in liquid medium , which are displayed earlier using an inverted light microscope . El presente study aims to compare the MODS assay with conventional microbiological techniques for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in La Paz Bolivia . The study population consisted of patients with respiratory symptoms (SR) that attended the : National Thorax Institute , Hospital Municipal Caranavi Boliviano Dutch Hospital , University Hospital , Korean Hospital and Maternity Hospital Los Andes. A sputum sample per patient was collected , to which they did smear and culture for smear positive specimens in their respective health centers, these samples were decontaminated with TB Base Digestant Network They were planted in the middle Lowenstein Jensen media and commercial Middlebrook 7H9 .

Of the 150 samples collected 75 samples were smear positive and 75 were smear negative. Comparing with MODS alensayo smear and Lowenstein Jensen commercial, a force of almost perfect agreement was obtained. Comparing the MODS assay smear , MODS sensitivity 96 % and specificity of 93 % was obtained. using Business Lowenstein Jensen as the reference test , had a sensitivity and MODS specificity of 100 % . In verifying the concordance between MODS assay and culture standardized by the National Tuberculosis Network , a strength of agreement was obtained almost perfect

The average time for the availability of positive results in MODS was 6 days . En el standardized by the National Network of Tuberculosis culture was 34 days and in the culture business Lowenstein Jensen average was 23 days. The MODS assay outperforms conventional microbiological methods used in our country, as this was able to detect the M. tuberculosis in sputum samples with high sensitivity, specificity and faster especially with an economic and technological investment

Guests
Keywords: Mycobacterium tuberculosis, MODS , tuberculosis, Lowenstein Jensen medium , smear .

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa, producida por el *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), de evolución crónica que puede ser controlada y curada. ⁽¹⁾ En la mayoría de los países del mundo, una elevada proporción de los casos se presentan en la población de 15 a 54 años; edades en las cuales los individuos son activos económicamente; situación que afecta el sistema productivo de las comunidades donde viven estas personas. ⁽²⁾ El agente etiológico es el Bacilo de Koch o Bacilo de la Tuberculosis, generalmente afecta a los pulmones, aunque también se puede diseminar y afectar a otros órganos de nuestro cuerpo (tuberculosis extrapulmonar). ⁽³⁾

Una persona que presente TB activa infecta alrededor de 10 a 15 individuos cada año. Un tercio de la población mundial, está infectada con *M. tuberculosis*; 1 de cada 10 personas infectadas sufrirá la enfermedad activa en su vida. ⁽⁴⁾

Se calcula que el año 2011 hubo 8,7 millones de nuevos casos de TB (un 13% coinfectados por la inmunodeficiencia humana (VIH)) y que 1,4 millones de personas murieron por esta causa (cerca de 1 millón seronegativas para el VIH, y 430 000 seropositivas). La TB es una de las principales causas de muerte en mujeres; el año 2011 causó 300 000 muertes en mujeres seronegativas para el VIH y 200 000 en mujeres seropositivas. ⁽⁵⁾

Anualmente en Bolivia se registran entre 6.000 a 7.000 casos nuevos de personas con TB. En 2012, el Programa Nacional de Control de Tuberculosis en Bolivia (PNCT), reportó 7.811 casos de Tuberculosis en todas sus formas, que representa una tasa de incidencia de 72,2 por 100.000 habitantes, de los cuales 6.139 son de TB pulmonar. ⁽⁶⁾

La baciloscopia y el cultivo son la base en el diagnóstico de la TB en países con bajos recursos sanitarios. La baciloscopia es un método económico, fácil de implementar y proporciona resultados rápidos, pero la sensibilidad de la baciloscopia depende de la calidad de las muestras de esputo, y la especificidad es solamente para bacilos ácido resistente.⁽⁷⁾

La baciloscopia permite detectar al 56% de los casos, pero algunos estudios demuestran que es capaz de detectar tan solo al 30% de los casos.⁽⁸⁾ La baciloscopia de esputo para el control mundial de la TB pierde la mitad de los casos incidentes en la primera presentación.⁽⁹⁾

El cultivo complementa a la baciloscopia ya que permite poner en evidencia bacilos viables presentes en escasa cantidad en una muestra de lesión, caracterizarlos para certificar que sea el bacilo de la tuberculosis y conocer si es sensible o resistente a las drogas antituberculosas.⁽¹⁰⁾ Este método es de mayor complejidad y costo, además los resultados se obtienen entre 40 y 60 días después del procesamiento de la muestra.⁽¹¹⁾

El ensayo MODS (Susceptibilidad a fármacos mediante observación microscópica) es una prueba rápida, relativamente simple que fue desarrollado recientemente en Perú. El método se basa en la observación de cordones característicos de *M. tuberculosis* cuando crece en medio líquido, los cuales son visualizados tempranamente mediante el uso de un microscopio luz invertida.

Sin embargo el método, ha sido diseñado para la detección del crecimiento de *M. tuberculosis* y la susceptibilidad a isoniacida (INH) y rifampicina (RIF), el presente estudio pretende enfocarse en la comparación de la capacidad del ensayo para detectar al bacilo frente a otros dos métodos microbiológicos que son actualmente utilizados en el

diagnóstico de rutina y de esta manera demostrar la simplicidad de la técnica, la gran sensibilidad, la especificidad y el bajo costo que son las mayores ventajas para su uso en países en vías de desarrollo.

2. ANTECEDENTES

La TB está presente en mayor número, en el Sudeste Asiático y África, seguidos por América Latina y el Este de Europa. Se estima que hasta el 2020 existirán 36 millones de personas fallecidas por esta enfermedad. Por lo cual es necesario la incorporación de métodos rápidos, sensibles y específicos para el diagnóstico de TB.

El descubrimiento del agente causal de la TB, por el Dr. Robert Koch en Alemania en 1882, permitió avanzar en el diagnóstico microbiológico de esta enfermedad. Tanto la baciloscopia como el cultivo del *M. tuberculosis* en medio Lowenstein Jensen (LJ) han sido y son técnicas básicas en el diagnóstico de TB. El cultivo y la identificación del bacilo se dejan para casos de incertidumbre diagnóstica, casos de una mala evolución al tratamiento y TB extrapulmonar.

Entre otros métodos de diagnóstico esta la radiografía de tórax. En un estudio de la India de 2229 pacientes examinados fluoroscópicamente, 227 fueron clasificados con TB, de ellos 81 pacientes tuvieron cultivo negativo (36%) y se encontraron 31 (1.5%) con estudio considerado normal pero con cultivos positivos.⁽¹²⁾ Esto confirma que el aislamiento del bacilo de Koch mediante la bacteriología es el principal método de diagnóstico.

En los últimos 15 años se realizaron diferentes investigaciones con el objetivo de mejorar la rapidez, sensibilidad, especificidad y costos para el diagnóstico de TB.

En Perú se ha desarrollado la prueba rápida MODS, una prueba fenotípica que detecta el crecimiento de microcolonias con patrón de cordones (agregación de bacilos tuberculosos formando estructuras serpenteantes característica única de *M. tuberculosis*) en

pozos con medio líquido enriquecido y con antibióticos; a través de la visualización diaria durante un período con un microscopio de luz invertida.

El método MODS reportó mayor capacidad de diagnóstico de TB con respecto al medio LJ.⁽¹³⁾ El ensayo MODS ha sido desarrollado y validado en el Perú,^(13; 14) y replicada en otros países.^(15; 16)

Anteriores estudios indican que, la tasa de detección de cultivo fue significativamente mayor en MODS (96,9%) que en el método LJ (94,3%),⁽¹⁵⁾ considerando que obtuvieron estos resultados solo al trabajar en muestras con baciloscopia positiva.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La TB es una enfermedad que continúa siendo un problema serio de salud pública para el mundo, causando millones de casos nuevos cada año, a pesar de que se puede prevenir y curar.⁽⁸⁾ Se estima que alrededor de un tercio de la población mundial, dos mil millones de personas, están infectadas con *M. tuberculosis*; aproximadamente 8 millones de ellos enferman anualmente y cerca de dos millones mueren por la enfermedad, aun cuando se cuenta con técnicas de diagnóstico sencillas, precisas y tratamientos eficaces.⁽¹⁷⁾

Entre las pruebas utilizadas comúnmente para confirmar la enfermedad de TB se pueden mencionar a la baciloscopia y el cultivo en medio semisólido (Lowenstein Jensen, Stonebrik y Ogawa).

En los últimos 100 años, la única prueba rápida para el diagnóstico de TB ha sido el examen microscópico, cuya sensibilidad es aceptable cuando la muestra analizada contiene más de 100.000 bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR)/ml.⁽¹⁸⁾ Este alto contenido de bacilos se encuentra en aquellos pacientes con enfermedad avanzada y con lesiones cavitadas. Estos pacientes son los que transmiten los bacilos manteniendo la enfermedad en la comunidad.⁽¹⁷⁾ La baciloscopia es una técnica económica, fácil de implementar y proporciona resultados rápidos. Sin embargo, posee baja sensibilidad: 30 a 40% de los pacientes con TB pulmonar cursan con baciloscopia negativa.^(19; 20)

Entre las desventajas de la baciloscopia se pueden mencionar las siguientes: no detecta casos de TB activa en un 50% del tiempo. Solo es útil para TB pulmonar. No detecta TB extra pulmonar. Hasta un 61% de personas con VIH tienen una baciloscopia de esputo negativa, por lo tanto la prueba da un resultado incorrecto, retrasando el diagnóstico y tratamiento adecuado.⁽²¹⁾

Por otro lado la ventaja del cultivo en medio solido es la alta sensibilidad que le permite detectar un mínimo de 10 a 100 bacilos por mililitro de muestra, además permite estudiar los bacilos vivos por técnicas de identificación. Entre las desventajas se puede mencionar que es un método de mayor complejidad y costo, además los resultados se obtienen entre los 40 a 60 días.⁽¹¹⁾ Si bien la complejidad del cultivo y su costo resultan ser mayores que la baciloscopia, es una mejor alternativa en comparación a otras técnicas sofisticadas.⁽⁸⁾

Tomando en cuenta las desventajas de la baciloscopia y el cultivo, se requiere la incorporación de una prueba de diagnóstico que permita obtener resultados en menor tiempo, con una alta sensibilidad, especificidad y de bajo costo; ya que el costo es un factor importante para cualquier intervención de salud, en particular en los entornos con recursos limitados. Al obtener resultados en menor tiempo se podrá comenzar con el tratamiento adecuado y de esta manera se disminuirá su transmisión.

4. JUSTIFICACIÓN

Una de las prioridades en la investigación de TB es generar técnicas diagnósticas de bajo costo y baja complejidad que mejoren la sensibilidad, sean universalizables y aplicables en niveles de atención primaria y secundaria.⁽²²⁾

Este estudio pretende comparar una de las técnicas más modernas en el campo del diagnóstico de TB, el MODS, bajo el criterio de bajo costo y baja complejidad, frente a técnicas microbiológicas convencionales. Esto podría permitir abaratar los costos diagnósticos (en los países de alta rentabilidad) y la accesibilidad al tratamiento en los países de baja rentabilidad.

El MODS es una técnica de reciente implementación basada en la observación por microscopio invertido del crecimiento de *M. tuberculosis* en cultivo líquido y concomitante determinación de perfil de resistencias. Algunos estudios apuntan que el MODS aumenta hasta 4 veces la velocidad de detección del *M. tuberculosis* (respecto a los medios sólidos), mejora la sensibilidad diagnóstica, además el MODS presenta bajo costo y una complejidad relativamente baja respecto a otras técnicas.^(13; 14) Estas características hacen a la técnica candidata a ser la prueba de diagnóstico estándar en los laboratorios de referencia y por ese motivo ya fue probado en países como Perú, India y Vietnam. Cabe resaltar que desde el año de 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) aprobó el uso del MODS como técnica diagnóstica de TB.⁽²³⁾

Por los motivos descritos anteriormente se justifica la necesidad de evaluar esta nueva técnica en nuestro país, con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos en otros países y revalidar la prueba para el contexto boliviano a fin de poder ofertar a corto plazo este tipo de pruebas innovadoras a la población.

5. HIPÓTESIS

El ensayo MODS ofrece una alternativa de diagnóstico de TB más rápida, sensible y de mayor especificidad para aplicarla en pacientes con sospecha de TB, a partir de una sola muestra de esputo, comparando con los métodos microbiológicos convencionales (baciloscopia y cultivo en medio solido).

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

✓ Comparar el ensayo MODS (Susceptibilidad a Fármacos mediante Observación Microscópica) con técnicas microbiológicas convencionales, para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, en La Paz Bolivia.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Determinar la concordancia del ensayo MODS con la baciloscopia y el cultivo comercial.

✓ Determinar los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos del MODS frente a la baciloscopia.

✓ Determinar los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos del MODS frente al cultivo en Lowenstein Jensen comercial.

✓ Verificar la concordancia entre cultivo microbiológico estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis y el ensayo MODS en muestras con baciloscopia positiva.

✓ Comparar el tiempo de detección del crecimiento de M. tuberculosis en MODS, en cultivo Lowenstein Jensen comercial y en el cultivo estandarizado por la Red Nacional Laboratorios de Tuberculosis

7. MARCO TEÓRICO

7.1. DEFINICIÓN DE TUBERCULOSIS

La TB es una enfermedad social de naturaleza infecto-contagiosa de evolución crónica, curable y de notificación obligatoria; social porque afecta preferentemente a sectores económicamente deprimidos, infecto-contagiosa porque está provocada por un microorganismo, *M. tuberculosis* o bacilo de Koch; y curable puesto que con tratamiento óptimamente estandarizado y supervisado se pueden curar el 100% de los enfermos.⁽²⁴⁾

Enfermedades infecto-contagiosas, son las enfermedades de fácil y rápida transmisión, provocadas por agentes patógenos,⁽²⁵⁾ en este caso *M. tuberculosis*. Se denomina infección a la entrada, desarrollo y multiplicación de un agente infeccioso.⁽²⁵⁾

La infección tuberculosa es el resultado del contacto de *M. tuberculosis* con un determinado individuo, dando lugar en su organismo a una respuesta inmune tipo hipersensibilidad celular retardada. Las personas sólo infectadas no presentan síntomas, signos ni hallazgos radiológicos que sugieran enfermedad activa. La enfermedad tuberculosa se caracteriza por la presencia de síntomas, signos y hallazgos radiológicos que sugieren enfermedad activa y que dependerán de la localización de la enfermedad.⁽²⁶⁾

7.2. HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS

Se ha conocido a la TB a través de la historia como consunción, tisis, o también se le llamó "El mal del rey" por el mito de que podría ser curada por el toque de un monarca reinante.⁽²⁷⁾ Es considerada una de las primeras enfermedades humanas de las que se tiene constancia. Aunque se estima una antigüedad entre 15.000 y 20.000 años.⁽²⁸⁾

Se cree que en algún momento de la evolución, alguna de las especies de micobacterias saltó la barrera biológica por presión selectiva, y pasó a tener un reservorio

en animales. Esto, posiblemente, dio lugar a un primer espécimen del *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), que es la aceptada por la mayoría como la más antigua de las especies que integran el denominado complejo *Micobacterium* (que incluye *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*). El paso siguiente sería el paso del *M. bovis* a la especie humana, coincidiendo con la domesticación de los animales por parte del hombre .⁽²⁹⁾

Hipócrates pensaba que la enfermedad se hereda en gran medida, mientras que Aristóteles hizo hincapié en su carácter contagioso, al igual que Galeno (el más grande de los médicos romanos), que clasificó a la TB dentro de las enfermedades transmisibles como la peste o la sarna. La TB reapareció en la segunda mitad del siglo XVII, donde los médicos italianos continuaron con las ideas de Galeno al seguir manteniendo la idea que la TB era contagiosa. En 1865, Jean-Antoine Villemin, un médico militar francés, informó de que había sido capaz de contagiar a los conejos de laboratorio mediante la inoculación con tejido tuberculoso de un cadáver.⁽²⁷⁾

Una de las figuras médicas más importantes del siglo XIX, dedicadas al estudio de la fisiología es René Théophile Hyacinthe Laënnec, que moriría con TB a los 45 años, contraída en el contexto de sus estudios con pacientes y cadáveres infectados; diseñó el estetoscopio y se afanó por corroborar que sus hallazgos auscultatorios correspondían con lesiones pulmonares realizando observaciones comparativas entre los hallazgos en vida y la disección posterior de los pacientes tras el fallecimiento (se le considera por ello precursor del método anátomo-clínico).⁽²⁹⁾

En 1882, Robert Koch describió el agente etiológico de la TB y lo denominó *Bacterium tuberculosis*.⁽³⁰⁾ El nombre inicial fue sustituido por el de *M. tuberculosis* en 1896 por Lehmann y Neumann.⁽³¹⁾ Robert Koch emplea un novedoso método de tinción y

lo aplica a muestras de esputo procedentes de pacientes con TB, revelándose por primera vez el agente causante de la enfermedad: *M. tuberculosis*, o bacilo de Koch, en su honor.

(29)

En 1908 Koch desarrolla la tuberculina en colaboración con el veterinario Camille Guérin (1872-1961) un derivado proteico purificado estándar del bacilo (PPD) que creía útil como agente inmunizante, pero Charles Mantoux depuraría posteriormente para administrar por vía intradérmica como método diagnóstico.⁽²⁹⁾

En 1921 Albert Calmette y Camille Guérin producen la vacuna contra la TB (BCG), empleando una variante atenuada del *M. bovis*. En 1944, en plena Guerra Mundial, Albert Schatz y Selman Waksman descubren a partir de un pequeño hongo capaz de inhibir el crecimiento del *Mycobacterium* denominado *Streptomyces griseus* la estreptomicina (por lo que este último recibirá el premio Nobel de Medicina), con una eficacia limitada pero superior a los tratamientos dietéticos y balneoterápicos empleados hasta ese momento. Este hito se considera el comienzo de la era moderna de la TB, aunque la verdadera revolución se produce algunos años después, en 1952, con el desarrollo de la Isoniacida (hidracina del ácido isonicotínico), el primero de los antibióticos específicos que conseguirán convertir a la TB en una enfermedad curable en la mayoría de los casos. La aparición de la Rifampicina en la década de los sesenta acertó notablemente los tiempos de curación, lo que hizo disminuir el número de casos nuevos de manera importante hasta la década de los ochenta.⁽²⁹⁾

La morbilidad y mortalidad por TB disminuyó constantemente durante el siglo 20 en el mundo desarrollado, con la ayuda de mejores prácticas de salud pública y el uso generalizado de la vacuna, así como el desarrollo de los antibióticos en la década de 1950.

Sin embargo, esta tendencia a la baja terminó y el número de nuevos casos comenzó a aumentar a mediados de 1980. Las causas principales de este aumento fueron la falta de vivienda y la pobreza en el mundo desarrollado y el surgimiento del SIDA, con la destrucción de la respuesta inmune mediada por células en personas coinfectadas. ⁽²⁷⁾

7.3. CARACTERISTICAS GENERALES DE *M. tuberculosis*

Las micobacterias en general pueden variar mucho en su morfología, desde formas cocoides pequeñas a largos filamentos, *M. tuberculosis* suele tener una morfología característica, bacilo delgado de forma recta o ligeramente curvada en frotis teñidos, y su tamaño suele ser de 1-4 micras de largo por 0,3-0,5 micras de ancho. ⁽³²⁾

Es un Bacilo Alcohol-Ácido Resistente (BAAR) frecuentemente incolora, aeróbica estricta. Su crecimiento está subordinado a la presencia de oxígeno y al valor del pH circundante. Es muy resistente al frío, la congelación y la desecación; por el contrario muy sensible al calor, luz solar y luz ultravioleta. Su multiplicación es muy lenta (se divide cada 16 a 20 horas) y ante circunstancias adversas puede entrar en estado latente, pudiendo retrasar su multiplicación desde algunos días hasta varios años. ⁽³³⁾ No producen endosporas ni cápsulas. ⁽³⁴⁾ Estos bacilos forman filamentos ramificados; sin embargo estos pueden romperse con facilidad. ⁽³⁵⁾

Aunque las micobacterias no parecen encajar en la categoría Gram-positiva desde un punto de vista empírico (es decir, que no retienen el tinte violeta), se clasifican como bacterias ácido-resistentes Gram-positivas. Todas las especies de *Mycobacterium* comparten una característica pared celular, más gruesa que la de muchas otras bacterias, hidrofóbica, cerosa, y rica en ácidos micólicos/micolatos. La pared celular es rica en lípidos, lo que hace que su superficie sea hidrófoba y confiere a las micobacterias

resistencia frente a varios desinfectantes y las tinciones de laboratorio. Esta pared celular proporciona una contribución sustancial a la resistencia de este género de bacterias^(35; 36).

Esta gruesa pared consta de cuatro capas. La más interna es el glicopéptido o peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido-N-glucolilmurámico (en lugar del habitual N-acetilmurámico) con cortas cadenas de alanina. Esta capa es el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez. Externamente, hay otras 3 capas compuestas, una por polímeros de arabinosa y galactosa, otra formada por ácidos micólicos (que son ácidos grasos derivados) y otra superficial formada por lípidos como los sulfolípidos, el cord factor, llamado así por su aparente asociación con la forma acordonada con que se agrupan las micobacterias virulentas, y los micósidos que son al igual que el anterior glicolípidos. (Figura 1) No difiere del resto de las bacterias en cuanto al citoplasma y el ADN nuclear.⁽³²⁾

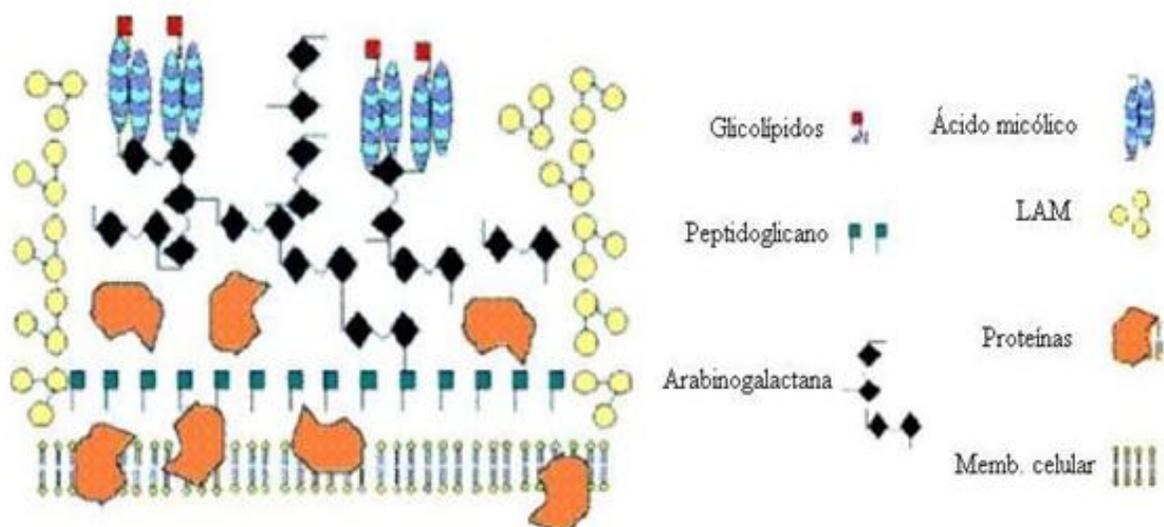


FIGURA 1. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. La bacteria está envuelta dentro de una bicapa lipídica típica de membrana citoplasmática que permanece debajo del peptidoglicano rígido (PG). Cierta número de proteínas se encuentran en asociación con PG y entre la membrana, los PG y algunas de ellas pueden ser inmunogénicas.

Fuente: Winn W., Allen S., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., et al. 1997.

Los componentes lipídicos abarcan el 60% del peso de la pared, lo que hace al microorganismo resistente a desinfectantes, detergentes, antibióticos antibacterianos frecuentes y tinciones tradicionales.⁽³⁵⁾ A lo largo de las capas de la pared se intercalan proteínas transportadoras y porinas, las que constituyen el 15% del peso de la pared. Las proteínas constituyen antígenos importantes para estimular la respuesta del anfitrión a la infección y pueden usarse como prueba pronóstica.⁽³⁴⁾

El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (cepa control más utilizada para la identificación de *M. tuberculosis* en la clínica y laboratorios de investigación) consiste en 4.4×10^6 pares de bases, conteniendo aproximadamente 4.000 genes. Alrededor de 200 de estos genes están involucrados en la codificación de enzimas relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos. Así mismo, otra característica del genoma de *M. tuberculosis* es la presencia de genes codificadores de proteínas ricas en glicina y de las familias de proteínas PE y PPE, los nombres derivan de las secuencias de aminoácidos Pro - Glu (PE) y Pro-Pro-Glu (PPE) encontradas en las regiones N-terminal de cada una de estas proteínas, que tienen aproximadamente de 110 y 180 aminoácidos.⁽²⁷⁾

7.4. TUBERCULOSIS PULMONAR

Es una infección bacteriana contagiosa que compromete los pulmones y que se puede propagar a otros órganos, se caracteriza por la formación de tubérculos que pueden causar necrosis tisular. Es causada por la bacteria *M. tuberculosis*,⁽³⁷⁾ el cual es un patógeno intracelular capaz de producir infecciones de por vida.⁽³⁵⁾

La TB se desarrolla en el organismo humano en dos etapas: a) la primera ocurre cuando un individuo que está expuesto por primera vez al bacilo se infecta (infección tuberculosa) y b) la segunda etapa sucede cuando el individuo infectado desarrolla la

enfermedad (enfermedad tuberculosa). Aproximadamente el 10% de los infectados pueden desarrollar TB durante su vida, mientras que el 90% restante no enferma, si no está coinfectado con el VIH. En individuos coinfectados (TB/VIH), el riesgo de progresión de la infección a enfermedad TB es del 50% durante su vida. ⁽²⁴⁾

La TB es una enfermedad de grupos cerrados (familias, colegios, orfanatos, cárceles, etc.) ya que el bacilo de la tuberculosis se inactiva con los rayos ultravioleta y es por eso que la posibilidad de contagio en espacios abiertos es baja. La ingestión del bacilo raramente produce infección intestinal porque es inactivado por el pH ácido del estómago.

⁽³⁸⁾ La enfermedad también puede ser provocada por el *M. bovis*, sin embargo, últimamente su rol ha disminuido en la medida que la población toma leche pasteurizada o hervida. ⁽²⁴⁾

7.4.1. TRANSMISIÓN DE LOS BACILOS TUBERCULOSOS

El potencial de infectividad de un paciente con TB depende, fundamentalmente, de 4 factores: 1) severidad y frecuencia de la tos, 2) carácter y volumen de las secreciones, 3) número de bacilos de la fuente de infección (los pacientes con baciloscopia positiva son los más infectantes), y 4) uso de la quimioterapia (después de 2 semanas de tratamiento, se produce una reducción en el número de bacilos cercana al 99%). Además, existen otros factores que pueden influir en la transmisión, como son los factores ambientales (ventilación de la habitación del enfermo, uso de mascarillas por el paciente, etc.), y los condicionantes de la exposición (cercanía al enfermo y tiempo). ⁽³⁹⁾

La contagiosidad de un caso de TB está determinada por la concentración de los microorganismos en el interior de los pulmones del enfermo y su difusión hacia el ambiente (aire). Un paciente con TB pulmonar bacilífera (BAAR +) puede expeler al toser, estornudar, hablar, gritar, cantar, microgotas (gotitas de Flügge) que contienen bacilos, los

cuales a través del aire, pueden introducirse en los pulmones de otros individuos y determinar el contagio.⁽²⁴⁾

Estos tuberculosos pulmonares BAAR (+) son los enfermos más contagiosos. Sin embargo, generalmente se requiere de la exposición prolongada con un enfermo BAAR (+) para que se infecte una persona, lo que ocurre principalmente entre los mismos miembros de la familia, en el trabajo, la escuela y en círculo de amistades. El hacinamiento, poca ventilación, ambientes secos y oscuros favorecen la transmisión de los bacilos. Los microorganismos infectan al individuo, se propagan desde su localización inicial en los pulmones a otras partes del organismo mediante: el sistema linfático, el flujo sanguíneo, las vías respiratorias o por extensión directa a otros órganos.⁽²⁴⁾

En general, para infectarse de TB se requiere un contacto intenso y prolongado con una persona bacilífera. En el contagio influyen factores como la cantidad de bacilos presentes en la expectoración del enfermo, el grado de intimidad, la duración de la exposición, la edad del contacto (mayor riesgo en niños) y el estado inmunológico del mismo. Los siguientes factores pueden incrementar la tasa de infección tuberculosa en una población: Aumento de las infecciones por VIH. Aumento del número de personas sin hogar (ambiente de pobreza y mala nutrición). Aparición de cepas de TB fármaco resistentes.⁽³⁷⁾

Los infectados con mayor riesgo de desarrollar la enfermedad son: a) los conversores recientes de la tuberculina (la máxima probabilidad se da en el primer año, es de alrededor del 5-8% en los 2 primeros años y después disminuye progresivamente; en coinfectados por el VIH sin tratamiento antirretroviral aumenta al 5-10% anual); b) los individuos con infección por el VIH y otros inmunodeprimidos (por enfermedades o por

tratamientos inmunodepresores, así como por tratamientos biológicos, entre los que cabe destacar, por la importancia que han adquirido, los fármacos contra el factor de necrosis tumoral alfa); c) los que tienen lesiones tuberculosas pulmonares residuales que nunca han sido tratadas, y d) los niños menores de 5 años.⁽⁴⁰⁾

Aunque la TB puede afectar a cualquier persona, hay diversos colectivos que presentan una mayor incidencia, con probabilidades muy variables (Cuadro1). Estos factores de riesgo ya clásicos podrían también agruparse en 4 grandes categorías⁽⁴¹⁾: a) biológicos (enfermedades diversas, VIH y otras inmunodepresiones, deficiencia de vitamina D, factores genéticos); b) conductuales (tabaquismo, alcoholismo, otras toxicomanías); c) sociales (viviendas insalubres, pobreza, problemas sanitarios, instituciones cerradas), y d) ambientales (silicosis, asbestosis)

Situaciones clínicas	Riesgo relativo
VIH y sida	100-500
Silicosis	30
Derivación gastrointestinal	27-63
Trasplante: renal, cardíaco, pulmonar y otros	20-74
Carcinomas	16
Hemodiálisis/insuficiencia renal crónica	10,0-25,3
Gastrectomía	2-5
Diabetes mellitus	2,0-4,1

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

CUADRO 1. Riesgo de desarrollar tuberculosis según diversas situaciones clínicas
Fuente: American Thoracic Society,2000

Los casos de TB pulmonar BAAR (-) pero cultivo positivo son 10 veces menos contagiosos que los BAAR (+).⁽²⁴⁾ Los microorganismos depositados en la piel o las mucosas intactas no invaden los tejidos y, por tanto, no son infectantes.⁽⁴²⁾

7.4.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Pueden ser muy diversas y similares a otras enfermedades, por lo que es necesario un alto nivel de sospecha que se establece en la historia clínica.⁽²⁶⁾ En el comienzo de la enfermedad, las personas con TB pueden tener síntomas comunes a otras enfermedades, como son fiebre, cansancio, falta de apetito, pérdida de peso, depresión, sudor nocturno y disnea en casos avanzados; más cuando se agregan las aflicciones de tos y expectoración purulenta por más de quince días debe estudiarse, pues se considera un síntoma respiratorio.⁽³⁴⁾

Clínicamente la TB se puede manifestar por signos y síntomas pulmonares, los cuales incluyen:

Neumonía tuberculosa: Puede deberse a primo infección o a reactivación. Si los bacilos infectan por primera vez a un individuo, ocurre la “primo infección” la que produce un cuadro clínico muy leve, en ocasiones asintomático y a veces el “complejo primario” puede ser visible en las radiografías de tórax acompañado del viraje positivo de la tuberculina (PPD).⁽²⁴⁾ El bacilo tuberculoso establece una infección localizada que, al principio, da por resultado pocos síntomas o signos clínicos, o incluso ninguno.⁽⁴³⁾

La primo infección se caracteriza por la formación del complejo primario de Ghon (adenitis regional parahiliar, linfangitis y neumonitis).⁽³⁴⁾ Casi siempre es asintomático. Puede hallarse febrícula, tos y astenia. En niños muy pequeños puede producir cuadros de tos, estridor y voz bitonal.⁽⁴⁴⁾

Los nódulos de Simón son formaciones nodulares apicales bilaterales y simétricas que aparecen en periodos inmediatos a la primo infección y se producen mediante siembras por vía hematogena a partir del complejo primario, es poco expresiva: puede haber febrícula, malestar general, etc. La evolución es benigna hacia la curación por reabsorción y raras veces se complican.⁽⁴⁴⁾

Tuberculoma, se trata de un nódulo solitario, único o múltiple, de aspecto redondeado u ovalado, de unos 3-6 cm de diámetro. Es una lesión aislada del organismo por esa gruesa capa hialina que lo delimita. Por eso, es clínicamente asintomático.⁽⁴⁴⁾

De los síntomas propiamente pulmonares, el más importante y frecuente es la tos, que puede ser seca o productiva, con expectoración mucosa, purulenta y en ocasiones hemoptoica. Es importante recordar que la contagiosidad está muy relacionada con este síntoma. La disnea se presenta en la enfermedad muy extendida. Una forma especial de inicio es la neumonía tuberculosa, que puede presentarse como un cuadro similar al de la neumonía bacteriana, incluso en las radiografías. En los pacientes infectados por el virus del VIH con inmunodepresión grave predominan los síntomas sistémicos y en el resto es similar a la población general.⁽²⁶⁾

Los síntomas se clasifican en dos categorías: generales y pulmonares. El general observado con más frecuencia es la fiebre de grado bajo, al progresar la enfermedad la fiebre se vuelve notable, de manera característica se desarrolla durante la parte final de la tarde, y quizá no se acompañe de síntomas importantes, salvo al final del día, cuando se instala la diaforesis, que se ha llamado “sudores nocturnos”. Al desarrollarse necrosis caseificante y licuefacción concomitante de la caseificación, el paciente tendrá a menudo tos y expectoración acompañado de hemoptisis leve, el dolor torácico suele ser localizado y

de tipo pleurítico. ⁽⁴⁵⁾ La neumonía tuberculosa es muy contagiosa, motivo por el cual los pacientes deben estar aislados durante 2 semanas desde el inicio del tratamiento . ⁽³⁴⁾

Pleuritis tuberculosa: Aparece generalmente en personas jóvenes y suele hacerlo de forma aguda y unilateralmente. El signo principal es un exudado en el espacio pleural. Característicamente en este exudado se puede detectar la enzima adenosin - desaminasa (ADA) elevada. Asimismo el tipo celular predominante en el exudado son los linfocitos y las células mesoteliales son escasas. ⁽³⁴⁾ Se presenta con un cuadro de tos, febrícula y dolor torácico de características pleuríticas. Su presentación es lenta e insidiosa . ⁽⁴⁴⁾

La TB pulmonar de reactivación o posprimaria suele desarrollarse después de un periodo de latencia y se origina a partir de los sitios de diseminación hematogena, por tanto, la infección inicial por el bacilo de la TB a menudo carece de importancia clínica e inadvertida, en la mayoría de los pacientes la enfermedad se conserva latente por tiempo indefinido o durante muchos años, y cuando sobreviene un momento de debilitamiento puede ser secundaria a disminución de la inmunidad corporal. ⁽⁴⁵⁾

Sintomático Respiratorios (SR) es la persona que sufre de tos y expectoración por más de 2 semanas y que debe ser examinada con 3 baciloscopias de esputo. ⁽²⁴⁾

7.4.3. FISIOPATOLOGÍA E INMUNIDAD

Una vez que se inhala el M. tuberculosis, una serie de eventos inmunológicos lleva a tres posibles resultados: erradicación, infección primaria, infección latente . ^(46; 47)

El sitio de infección primario es el pulmón, en ocasiones crece con la progresión de la enfermedad y se resuelve, dejando una cicatriz visible que puede ser densa y presentar focos de calcificación. El riesgo de desarrollar TB activa es mayor en pacientes con

inmunidad celular alterada.⁽⁴⁸⁾ El bacilo no siempre es eliminado y permanece inactivo, causando una infección latente.⁽⁴⁹⁾

La infección inicia cuando el bacilo alcanza el alveolo pulmonar, lo invade y posteriormente es fagocitado por los macrófagos alveolares, donde se replica intracelularmente.⁽⁴⁸⁾ A diferencia de la mayor parte de las bacterias fagocitadas, *M. tuberculosis* impide la fusión del fagosoma con los lisosomas (al inhibir la molécula de unión específica, el antígeno endosomal específico 1 (EEA 1)). El fagosoma es capaz de fusionarse a otras vesículas intracelulares para facilitar el acceso del patógeno a nutrientes y su proceso de replicación intravacuolar. Aunque los macrófagos alveolares inician el proceso de fagocitosis, los macrófagos circulantes y los linfocitos son atraídos hasta los focos de infección por las bacterias, los restos celulares y los factores quimiotácticos propios del organismo anfitrión (por ejemplo el componente C5a del complemento). La característica histológica de este foco es la formación de células gigantes multinucleadas a partir de los macrófagos fusionados, conocidas también como células de Langhans.⁽³⁵⁾

La replicación intracelular de las micobacterias estimula tanto a los linfocitos T cooperadores (helper) (CD4+) como a los linfocitos T citotóxicos (CD8+). La activación de los linfocitos CD4+ lleva a la producción de anticuerpos, pero esta respuesta no es eficaz en el control de la infección por micobacterias puesto que las bacterias se encuentran protegidas en su localización intracelular. Los linfocitos T liberan también interferón γ y otras citoquinas que activan a los macrófagos. Los macrófagos activados pueden engullir y eliminar a las micobacterias. Los linfocitos T citotóxicos pueden lisar también a las células fagocíticas con las bacterias en replicación, lo que permite la fagocitosis y la destrucción de las bacterias de las células fagocíticas activadas. Cuando la concentración bacteriana es

elevada, la respuesta inmunitaria celular da lugar a la necrosis tisular. Muchos factores del anfitrión están implicados en este proceso, como la toxicidad de las citocinas, la activación local de la cascada del complemento, la isquemia y la exposición a enzimas hidrolíticas generadas por los macrófagos.⁽³⁵⁾

La eficacia de la destrucción bacteriana se relaciona en parte con el tamaño del foco de la infección. Las colecciones localizadas de macrófagos activados (granulomas) evitan posterior diseminación de las bacterias. Estos macrófagos pueden penetrar en los granulomas pequeños (menores de 3mm) y destruir a los microorganismos que se encuentran en su interior. Sin embargo, los granulomas más grandes se encapsulan con fibrina y protegen eficazmente a las bacterias de la eliminación producida por los macrófagos. Las bacterias pueden permanecer latentes en esta fase o se pueden reactivar algunos años más tarde, cuando disminuye la respuesta inmunitaria del paciente como consecuencia de la edad o por una enfermedad o un tratamiento inmunosupresor. Este es el motivo de que la enfermedad pueda no desarrollarse hasta etapas tardías de la vida en pacientes expuestos a *M. tuberculosis*.⁽³⁵⁾

7.5. EPIDEMIOLOGIA

La TB sigue siendo una de las principales amenazas de salud pública mundial, con más de 1,4 millones de muertes reportadas en 2010.⁽⁵⁰⁾ En los últimos años, ha tenido lugar en el mundo la emergencia o reemergencia de eventos epidemiológicos, entre ellos el incremento de la TB, que ha vuelto a surgir como problema sanitario de primera magnitud, tanto en los países en vías de desarrollo como en los desarrollados.⁽⁵¹⁾

Gran parte de la población de los países en desarrollo no tiene acceso a los servicios de asistencia de la salud, incluso aun cuando se dispone de estos servicios quizá no se

informen los casos a las autoridades sanitarias, o no se cuente con un sistema de vigilancia y de salud pública en el sitio para la obtención y el análisis de la información. Así mismo el instrumento diagnóstico principal, y a menudo el único, que se emplea en los países en desarrollo es el examen microscópico del esputo, que no permite identificar los casos de TB negativa al frotis y positiva al cultivo, o en los casos de formas extrapulmonares. Por tanto, siguen siendo indetectables los casos de TB en los países en desarrollo. ⁽⁵²⁾

La TB pulmonar es un problema mundial de salud pública, que es prevenible, tratable y erradicable. La OMS informa que una tercera parte de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis*. ^(53; 54)

Se estima que cada año hay en el mundo de 4 a 5 millones de casos nuevos de TB pulmonar con esputo positivo (expectorado de bacilos) y de 2 a 2.5 millones de defunciones por la enfermedad; además, si se toman en cuenta los casos de TB pulmonar con cultivo positivo y los extrapulmonares, la cifra se eleva a 8 a 10 millones de casos nuevos cada año. ⁽³⁹⁾

Los nuevos datos de la OMS sobre la TB en 2012 confirman que sigue siendo una importante causa de muerte de origen infeccioso. ⁽⁵⁵⁾ Esos datos muestran:

- Una disminución continua del número de personas que contraen la TB, aunque sigue habiendo una cifra enorme de nuevos casos: 8,7 millones en 2011.
- Aproximadamente 1,4 millones de muertes, de las cuales medio millón en mujeres, lo que hace de la TB una de las principales causas de muerte en este grupo.
- Una reducción de los nuevos casos y de las muertes en las seis regiones de la OMS, aunque las Regiones de África y Europa todavía no están en camino de lograr reducir la mortalidad en 2015 a la mitad de la registrada en 1990.

- Progresos persistentemente lentos en la lucha contra la TB multirresistente, de la que se calcula que solo se diagnostican uno de cada cinco casos mundiales.⁽⁵⁵⁾

La infección se adquiere habitualmente por vía aerógena por inhalación de partículas contaminadas, especialmente mediante las gotitas de Flügge que son proyectadas al toser. Por tanto, el contagio se realiza de persona a persona y por inhalación de polvo desecado del esputo tuberculoso, y es más frecuente en ambientes mal ventilados y en personas que conviven con pacientes tuberculosos. El reservorio lo constituyen las personas enfermas, a veces sintomáticas, pero muchas veces asintomáticas o apenas sintomáticas.⁽⁴⁴⁾

En la mayoría de los países del mundo, una elevada proporción de los casos se presentan en la población de 15 a 54 años; edades en las cuales los individuos son activos económicamente; situación que afecta el sistema productivo de las comunidades donde viven estas personas.⁽²⁾

Se calcula que cada persona tuberculosa contagia a 2-3 personas al año, pudiendo llegar hasta 10. Un paciente tuberculoso, si evoluciona hacia la curación, suele permanecer contagioso unos 2 años; si no se cura es contagioso durante toda la vida. Con tratamiento, la TB se cura actualmente y deja de ser contagiosa aproximadamente en unas 4 -6 semanas (el 100% a los 3 meses de tratamiento). La infección pulmonar adquirida por ingesta de leche contaminada por *M. bovis* es muy rara en la actualidad y no alcanza el 1%.⁽⁴⁴⁾

No todas las personas infectadas desarrollan la enfermedad. El riesgo de desarrollar la enfermedad por parte de una persona infectada viene dado por las condiciones higiénico - ambientales, por la estrechez y persistencia del contacto (cantidad de bacilos inhalados), por la edad (más frecuente en edades tempranas y avanzadas), y por la existencia de enfermedades de bases que puedan deprimir la inmunidad. Son enfermedades

de riesgo: diabetes mellitus, uremia, enfermedades infecciosas crónicas, sarampión, etilismo, gastrectomía, SIDA, drogadicción y tratamientos con corticoides o inmunosupresores.⁽⁴⁴⁾

La mortalidad varía de acuerdo con la forma de la TB y al estado inmunológico del paciente. La TB que responde al tratamiento estándar, su tasa de curaciones es > 95%⁽⁵⁶⁾, en pacientes con TB multirresistente es del 50 al 80%. Menos del 30% de los inmuno competentes logran la curación y más del 50% mueren dentro de los primeros cinco años del diagnóstico. En pacientes inmuno comprometidos con TB altamente resistente la mortalidad es del 90%.⁽⁵⁷⁾

Según datos ofrecidos por la OMS se estima que entre el año 2000 y 2020, cerca de un billón de personas se reinfectará nuevamente, 200 millones contraerán la enfermedad y 35 millones de personas morirán, si antes no se promueven medidas de control efectivas.⁽⁵⁸⁾

Las naciones de las Américas que mayor tasa de casos notificaron en el año 2000 fueron Perú, Haití, Bolivia, República Dominicana, Honduras y Ecuador. En este sentido, las tasas de la entidad se mostraron altas en ambos sexos justamente a partir de los 25 años hasta aquellos que contaron más de 65 años. No obstante, el grupo de edad con cifras más elevadas resultaron el de 25 a 34 años y el más bajo en niños de 0 a 14 años.⁽⁵⁹⁾

Según la OPS (Organización Panamericana de la Salud)/OMS, el riesgo anual de infección de TB en Bolivia es de aproximadamente 2 a 3 %. El mayor riesgo de infección se encuentra entre los contactos próximos al paciente bacilífero, especialmente aquellos que comparten la vivienda, lo que se agrava cuando existe hacinamiento y desnutrición, en estos casos la tasa de infección global puede llegar al 60 %.⁽³⁸⁾

La responsable del Programa Nacional de Control de Tuberculosis, Lourdes Carrasco, informó que Bolivia es el tercer país con más enfermos de TB, luego de Perú y Brasil. “Bolivia se encuentra dentro de los 12 países latinoamericanos observados por la OMS con las tasas más altas de TB”. En Bolivia, cada año mueren por TB 700 personas, como consecuencia de diagnósticos tardíos y por diferentes causas durante el tratamiento .

(60)

Anualmente en Bolivia se registran entre 6.000 a 7.000 casos nuevos de personas con TB. En 2012, el Programa Nacional de Control de Tuberculosis en Bolivia reportó 7.811 casos de TB en todas sus formas, que representa una tasa de incidencia de 72,2 por 100.000 habitantes, de los cuales 6.139 son de TB pulmonar. De los 6.139 casos de TB en Bolivia, 2.981, 2.013 y 1.055 casos corresponden a Santa Cruz, La Paz y Cochabamba respectivamente (Cuadro 2).⁽⁶⁾

REGIONAL	POBLACIÓN	SINTOMÁTICO RESPIRATORIO	NUEVOS			
			TB TODAS SUS FORMAS		TB PULMONAR TOTAL	
			Nº	TASA	Nº	TASA
BOLIVIA	10.823.003	90.121	7.811	72,2	6.139	56,7
LA PAZ	2.923.118	22.929	2.013	68,9	1.410	48,2
ORURO	458.110	3.692	182	39,7	104	22,7
POTOSI	799.334	6.258	411	51,4	318	39,8
COCHABAMBA	1.936.894	13.150	1.055	54,5	793	40,9
CHUQUISACA	671.056	7.525	330	49,2	271	40,4
TARIJA	547.035	6.356	424	77,5	357	65,3
SANTA CRUZ	2.939.859	26.103	2.981	101,4	2.517	85,6
BENI	460.708	3.179	328	71,2	286	62,1
PANDO	86.889	929	87	100,1	83	95,5

CUADRO 2. Notificación de Casos - Bolivia. Reporte del periodo: 2012 (enero-diciembre)
Fuente: Programa Nacional de Control de la Tuberculosis

7.6. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Los principales métodos de diagnóstico básico de la TB son la baciloscopia y el cultivo en medio Lowenstein Jensen.

La radiografía de tórax, la prueba de tuberculina (PPD) y estudios histopatológicos de tejidos (generalmente en muestras extrapulmonares) son métodos que pueden constituirse en diagnósticos en ausencia de una baciloscopia positiva y/o cultivo negativo.

También existen otros métodos modernos como los cultivos rápidos, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), cuantificación de antígenos y anticuerpos en suero de los enfermos (ELISA) ⁽²⁴⁾, que sin embargo no están reconocidos por la OPS/OMS para diagnóstico de rutina, simplemente son pruebas de apoyo.

7.6.1. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA

7.6.1.1. PRUEBA DE LA TUBERCULINA

El diagnóstico de la infección tuberculosa se basa en el resultado de la prueba de la tuberculina (PT). La prueba de Mantoux o de la tuberculina es una técnica normalizada por la OMS en 1964, que Charles Mantoux presentó en 1908 ante la Academia de Ciencia. Se basa en la capacidad de la micobacteria de inducir una reacción de hipersensibilidad retardada entre la 2a y 12a semana tras la infección, que son capaces de reconocer las fracciones antigénicas y desencadenar una respuesta frente al PPD tuberculínico . ⁽⁶¹⁾ Esta sustancia PPD es obtenido de un filtrado de un cultivo de M. tuberculosis esterilizado y concentrado. ⁽⁶²⁾

La prueba no es específica, los resultados son variables dependiendo de factores como la experiencia técnica, la aplicación en masa de la BCG (bacilo de Calmette y

Guérin),⁽¹²⁾ o por infección por micobacterias ambientales oportunistas (MAO) (Cuadro 3).

(63)

- Convivientes y contactos íntimos de pacientes tuberculosos
- Personas cuya radiografía de tórax presente imágenes indicativas de tuberculosis inactiva
- Personas con sospecha clínica y/o radiológica de presentar enfermedad tuberculosa
- Personas que si están infectadas tienen un especial riesgo para el desarrollo de enfermedad tuberculosa
- Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana -
Adicción a drogas por vía parenteral
- Marginación social
- Enfermedades inmunodepresoras: leucocitosis, linfoma y otras neoplasias
- Tratamiento inmunodepresor prolongado, tratamiento contra el factor de necrosis tumoral alfa y candidatos a trasplante
- Personas que si están infectadas constituyen un riesgo social y epidemiológico en caso de desarrollar tuberculosis activa
- Cuidadores de guarderías infantiles
- Personal docente
- Personal sanitario
- Personal de prisiones
- Estudios epidemiológicos y control de programas antituberculosos

CUADRO 3. Indicaciones para realizar prueba de la tuberculina

Fuente: Ruiz J., Blanquer R., Calpe J.L., Caminero J.A., Caylá J., Domínguez J.A., et al. 2008

En nuestro país el PPD que se utiliza es el RT23 Tween 80 con la técnica de Mantoux, no aconsejándose el uso de otras técnicas de aplicación.⁽²⁴⁾

Interpretación de resultados:

Se considerará que una PT es positiva cuando presente una induración igual o mayor de 5mm. En las personas vacunadas contra la TB no se puede discernir con seguridad absoluta si la reacción es debida a infección por M. Tuberculosis o es un

recuerdo de la vacuna. Sin embargo, a efectos prácticos, en los colectivos con alto riesgo de infección el antecedente de vacunación no debe tenerse en cuenta.

En los vacunados se acepta que la respuesta a la PT de 5 mm o superior es indicativa de infección por *M. tuberculosis*: en convivientes y contactos frecuentes de enfermos tuberculosos bacilíferos, en personas cuya radiografía de tórax ofrezca imágenes indicativas de TB inactiva (demostrada con bacteriología y control evolutivo), en infectados por el virus del VIH, o con factores de riesgo para infección por el VIH, y en silicóticos. Si el vacunado no se encuentra en ninguna de estas circunstancias, se valorará individualmente cada caso teniendo en cuenta (sin que nunca pueda descartarse que se deba a la vacuna antituberculosa) que a mayor diámetro de la induración obtenida, más probabilidad de que la causa de la respuesta a la PT sea la infección tuberculosa natural, en especial si la induración supera los 15 mm de diámetro.⁽⁶⁴⁾

Igualmente, la aparición de vesículas o de necrosis tiene que valorarse como indicativa de infección tuberculosa. Por otra parte, los resultados falsos negativos pueden deber sea defectos de la técnica o a enfermedades y situaciones que provoquen inmunodepresión, incluida la TB grave y la pleural. Además, es necesario recordar que tras la infección por *M. tuberculosis* han de transcurrir de 2 a 12 semanas para que los linfocitos T sensibilizados hayan pasado al torrente circulatorio y puedan reconocerla tuberculina depositada en la dermis. Durante este tiempo, aunque haya infección, puede no obtenerse respuesta a la PT. En general, no se detecta la positividad de una PT hasta pasados los 6 meses de vida.

La capacidad de respuesta a la tuberculina no permanece invariable durante toda la vida, ya que, aunque no llega a desaparecer, puede debilitarse con el tiempo. Este fenómeno

se observa en pacientes de edad avanzada que contrajeron la infección en su juventud y en vacunados no infectados por *M. tuberculosis*. En estos casos puede producirse el denominado efecto de refuerzo (booster), que consiste en la estimulación de la capacidad de respuesta al realizar la PT. Para no confundir el efecto de refuerzo con una conversión de la tuberculina, a los pacientes mayores y vacunados contra la TB que tengan una PT negativa,⁽⁶⁵⁾ hay que realizarles una segunda PT entre 7 y 10 días después, y el resultado de esta segunda PT será el que se tome como definitivo. Conviene remarcar que en un paciente no infectado la práctica repetida de la PT no induce sensibilidad tuberculínica. A efectos prácticos, se entiende por conversión de la tuberculina la que tiene lugar dentro de un período máximo de 2 años desde que hay constancia de una PT negativa.⁽⁶⁶⁾

7.6.1.2. TÉCNICAS IN VITRO DE INTERFERÓN-GAMMA

Debido a las limitaciones de especificidad y sensibilidad inherentes a la prueba de la tuberculina, se han desarrollado diversos inmuno ensayos basados en la detección de la secreción de Interferón (IFN)-gamma por linfocitos T del paciente tras incubarlos con determinados antígenos tuberculosos. Aunque estos métodos parecen tener una mayor especificidad, todavía está pendiente el conocer cuál es el papel exacto que pueden tener en el diagnóstico de la infección tuberculosa.⁽⁶²⁾ Las técnicas se basan en la detección del IFN γ liberado como respuesta a la estimulación in vitro de las células T sensibilizadas presentes en sangre periférica con antígenos específicos⁽⁶⁷⁾ de *M. tuberculosis*.

Actualmente se emplean para la estimulación de las células T los antígenos RD1 denominados early secretory antigen target-6 (ESAT-6) y culture filtrate protein 10 (CFP-10), y el antígeno RD11 RV26548⁽⁶⁸⁾. Que están presentes en el complejo *M. tuberculosis* pero ausentes tanto en la vacuna antituberculosa como en otras micobacterias ambientales

(excepto en *M. kansasii*, *M. marinum* y *M. szulgai*). Por lo tanto, estas técnicas discriminan a los individuos infectados por *M. tuberculosis* de los que han recibido la vacuna antituberculosa y de los expuestos a otras micobacterias. ^(69; 70) Además, incorporan controles para detectar la anergia y excluir así los falsos negativos. Por otra parte, pueden repetirse inmediatamente, sin que se vean afectadas por el efecto de refuerzo. ⁽⁶⁶⁾

Esta tecnología *in vitro* presenta algunas ventajas adicionales respecto a la PT: se evita la subjetividad en la interpretación de los resultados; la determinación puede repetirse si es necesario; la obtención de los resultados es rápida; se elimina la visita de lectura; se evita la pérdida de individuos que no acuden a la lectura; es de fácil estandarización y aplicación en el laboratorio; permite la inclusión de controles positivos para identificar a los pacientes anérgicos. El inconveniente de la técnica es su mayor costo económico. Se necesitan más estudios para determinar su eficiencia. ⁽⁶⁶⁾

7.6.2. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD TUBERCULOSA

Para el diagnóstico de certeza de enfermedad tuberculosa es absolutamente necesaria la obtención de un cultivo que demuestre el crecimiento de colonias de *M. tuberculosis*. Por ello, se deben realizar todos los esfuerzos posibles para obtener las muestras oportunas y absolutamente todas ellas deben ser procesadas por baciloscopia y cultivo. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos, en ocasiones no es posible conseguir la confirmación bacteriológica del diagnóstico de enfermedad tuberculosa. En estos casos, el juicio diagnóstico que va a avalar una conducta terapéutica específica se hade fundamentar en el conjunto de datos clínicos, radiológicos y de laboratorio que concurran en el enfermo.

⁽³⁹⁾

7.6.2.1. VALORACIÓN CLÍNICA

Las manifestaciones clínicas de la TB no permiten diferenciarla con precisión de otras enfermedades broncopulmonares. El comienzo es, la mayoría de las ocasiones, insidioso y poco alarmante, por lo que pueden pasar varios meses hasta que se llegue al diagnóstico de certeza. De ahí la importancia de que el médico ponga en marcha las exploraciones complementarias ante la más mínima sospecha, a veces incluso en sujetos asintomáticos (contactos, inmunodeprimidos, etc.).⁽³⁹⁾

La primo infección acostumbra ser sub clínica o dar síntomas inespecíficos. La persistencia de síntomas respiratorios en el niño durante más de diez o quince días hace aconsejable practicar radiografía de tórax, en especial si se acompañan de manifestaciones sistémicas o extrapulmonares (anorexia, pérdida de peso, eritema nudoso).⁽³⁹⁾

La TB del adulto tiene también con frecuencia un comienzo solapado en forma de tos, expectoración mucopurulenta, sudación nocturna, cansancio fácil, etc., aunque en algunas ocasiones el inicio es agudo, con fiebre alta, escalofríos, expectoración hemoptoica o hemoptisis franca. Una forma especial de comienzo es la neumonía tuberculosa, ya que puede aparentar el síndrome clínico radiográfico de la neumonía bacteriana. La exploración física no acostumbra ser de gran ayuda en el diagnóstico etiológico, ya que muchas veces es en apariencia normal.⁽³⁹⁾ Los patrones de decisión ante una sospecha de TB pulmonar quedan recogidos en la figura 2.

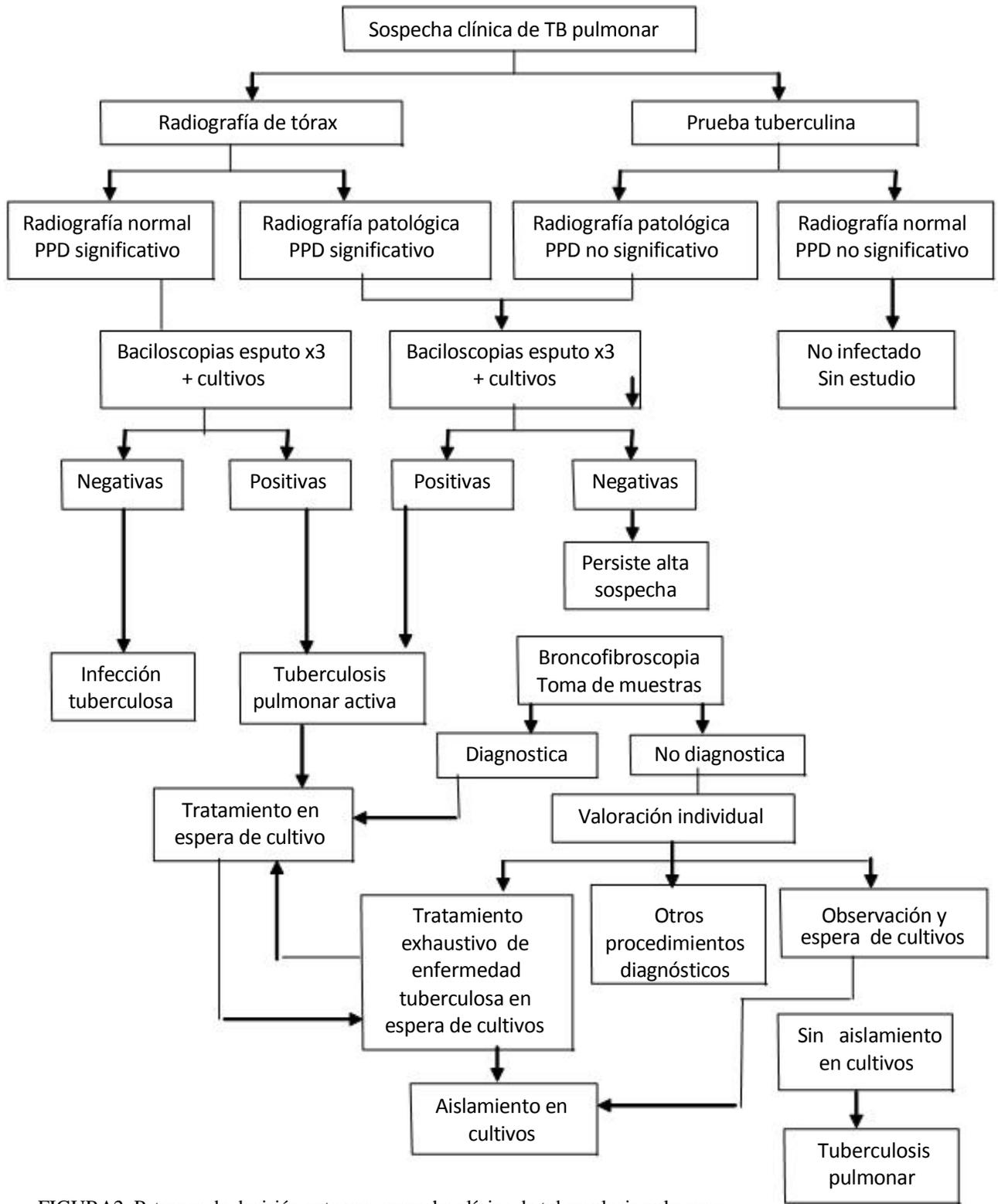


FIGURA2. Patrones de decisión ante una sospecha clínica de tuberculosis pulmonar
 Fuente: Caminero JA., Casal M., Ausina V., Pina JM., Sauret J. Diagnóstico de la Tuberculosis Disponible

7.6.2.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

El diagnóstico microbiológico de la enfermedad tuberculosa se establece en tres etapas sucesivas: ⁽²⁶⁾

1. Demostración de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) mediante tinciones específicas, en general auramina (más rápida) y Ziehl-Neelsen (estándar).
2. El aislamiento de *M. tuberculosis* en el cultivo puro y la posterior identificación de la especie.
3. En determinados casos, el estudio de sensibilidad in vitro a fármacos antituberculosos.

7.6.2.2.1. BACILOSCOPIA

A pesar de los múltiples avances efectuados en los últimos años en el diagnóstico de la TB, la baciloscopia mediante la técnica de Ziehl-Neelsen, continúa siendo la base del diagnóstico y seguimiento de la TB por su sencillez, rapidez, reproducibilidad en todos los ámbitos y bajo costo, además, porque detecta los casos contagiosos de la comunidad, lo que constituye la base del diagnóstico y seguimiento de la TB. ⁽⁶⁶⁾ La baciloscopia, es la técnica fundamental en toda investigación bacteriológica de la TB, en la detección de casos y control de tratamiento. Con un costo bajo y de rápida ejecución, la baciloscopia es una técnica que permite identificar al 70-80% de los casos pulmonares positivos.

La baciloscopia consiste en el examen microscópico directo de una muestra de expectoración que ha sido extendida sobre una lámina de vidrio y teñida mediante el método de Ziehl-Neelsen. ⁽²⁴⁾ La tinción de los bacilos va ligada a los ácidos micólicos de la pared micobacteriana, y éstos están presentes en el resto de las micobacterias y no se

pierden cuando el bacilo muere. Por lo tanto, una baciloscopia positiva puede corresponderse con *M. tuberculosis* vivo o muerto (lo que puede dificultar su interpretación en el seguimiento de los enfermos en tratamiento), o con otra micobacteria. ^(71; 72)

Con este método se detectan los microorganismos habitualmente calificados como BAAR y el laboratorio reporta según la siguiente calificación: ⁽²⁴⁾

Negativo (-): No se observan BAAR en toda la lámina.

1 a 9 BAAR: Se observan 1 a 9 BAAR en toda la lámina. (Se considera resultado positivo si existen bacilos visibles en dos muestras diferentes).

+: 10 a 99 BAAR en 100 campos observados.

++: 1 a 10 BAAR por campo en 50 campos observados.

+++: Más de 10 BAAR por campo en 20 campos observados.

Está demostrado que los bacilos de Koch se mantienen viables en una muestra no refrigerada durante 6 días, sin embargo, es recomendable fijar las muestras y no dejarlas al ambiente especialmente en lugares cálidos. ⁽²⁴⁾

En todo S.R. se deben obtener 3 muestras de expectoración, siempre que existan las condiciones operativas, se deben tomar las muestras de la siguiente forma: ⁽²⁴⁾

Primera muestra: El personal de salud durante la primera entrevista, debe solicitar al S.R. una muestra de expectoración “en el momento”, después de efectuar las explicaciones necesarias.

Segunda muestra: Después de haber obtenido la primera muestra, el personal de salud, debe entregar al paciente un envase para esputo a fin que recolecte una muestra en ayunas, “del día siguiente” que la llevará al servicio de salud.

Tercera muestra: En el instante en que el paciente entrega la segunda muestra, el personal de salud, debe proceder a la toma de una nueva muestra de esputo, la cual es recolectada en el sitio.

Es bien conocido el hecho de que existen limitaciones de sensibilidad y especificidad de la prueba de Ziehl Neelsen, de tal manera que para mejorar su valor predictivo positivo deben efectuarse al menos tres baciloscopías seriadas, (la segunda baciloscopia capta de un 7 a un 13% más de pacientes, la tercera, alrededor de 4% más de pacientes con TB) lográndose con esto hasta un 85% de detección del paciente tuberculoso bacilífero en localidades de moderada o alta prevalencia.⁽⁷³⁾

Su principal inconveniente es su moderada sensibilidad, que está condicionada por la localización y el grado de afectación de la enfermedad, la calidad de la muestra y el tiempo que dedica el observador para determinar que una baciloscopia es negativa. La sensibilidad (Para que la baciloscopia sea positiva es preciso que la muestra tenga como mínimo, entre 5.000 y 10.000 bacilos por mililitro de muestra,⁽⁷⁴⁾ puede incrementarse mediante la concentración de la muestra. Sin embargo, su especificidad es muy elevada, superior al 95%, tan sólo limitada por los falsos positivos que pueden aportar otras micobacterias ambientales o por otras causas técnicas muy infrecuentes. Por consiguiente, una baciloscopia negativa no descarta la TB, pero una baciloscopia positiva prácticamente la confirma en más del 95% de los casos y es indicación de iniciar tratamiento.^(71; 72)

La baciloscopia mediante técnica de fluorescencia (auramina) tiene la ventaja de un ahorro importante de tiempo en la lectura de la extensión (3-4 frente a 15-20 minutos en el caso de baciloscopia negativa), por lo que puede estar indicado como cribado en los centros

que procesan muchas muestras diarias. De todas formas, la baciloscopia positiva por fluorescencia debe confirmarse con la técnica de Ziehl-Neelsen.^(71; 72)

La tinción de Ziehl-Neelsen. Utiliza fucsina y fenol junto con el calentamiento de las preparaciones. Las micobacterias se tiñen de rojo, colorante que perdura pese a la posterior decoloración con una mezcla de alcohol-clorhídrico, sobre un fondo azul o verde, según se utilice como colorante de contraste el azul de metileno o verde malaquita. Exige la observación con el objetivo de inmersión (100x aumentos), por lo que, debido a que en muchas preparaciones la presencia de bacilos puede ser escasa, es necesario un mínimo de 10 minutos de observación antes de valorar el examen como negativo.⁽⁷⁵⁾

Uno de los problemas para el manejo individual de las muestras de esputo, es que la enfermedad debe haber avanzado sustancialmente, para que permita que la persona tenga concentraciones suficientes para que la tinción sea positiva (arriba de 10.000 bacilos/ml de esputo). En este sentido el cultivo es más sensible por cuanto requiere concentraciones mucho menores (10-100 bacilos/ml de esputo) con la limitante que el cultivo por medios sólidos requiere de varias (6-8 semanas) semanas para brindar el resultado.^(76; 77)

Para que la baciloscopia sea positiva es preciso que la muestra tenga como mínimo, entre 5.000 y 10.000 bacilos por mililitro de muestra.⁽¹⁷⁾ Cuando en 1 ml de esputo hay un millón de BAAR la baciloscopia siempre suele ser positiva. La sensibilidad claramente disminuye cuando el número de BAAR/ml de esputo es menor.⁽⁷⁵⁾

7.6.2.2.2. CULTIVO

El cultivo es la herramienta complementaria de la baciloscopia que permite con certeza realizar la confirmación del diagnóstico de la enfermedad, evaluar el seguimiento del tratamiento del enfermo hasta su curación, ya que permite poner en evidencia bacilos

viales presentes en escasa cantidad; y aislar la bacteria para desarrollar estudios de identificación, sensibilidad y resistencia. ^(11; 10)

El inconveniente es la larga espera necesaria para obtener el resultado (superiora 2-4 semanas, incluso con los métodos más rápidos) y el complejo procesamiento de la muestra limitan tremendamente su utilidad para la decisión clínica. ⁽⁶⁶⁾

El cultivo produce resultados tardíamente pero es más sensible que la baciloscopia. Puede evidenciar un mínimo de 10 a 100 BAAR por mililitro de muestra, si es realizado en forma adecuada. Permite detectar los casos antes de que lleguen a ser infecciosos. ^(11; 10)

Básicamente, hay 2 posibilidades de realizar los cultivos: en medio sólido y en medio líquido. El más utilizado y más barato es el medio sólido, sobre todo los preparados a base de huevo (Löwenstein-Jensen). Sin embargo, debido a las ventajas de una menor demora en obtener los resultados (2-4 frente a 3-8 semanas), la mayor sensibilidad y la posibilidad de automatización, poco a poco se han ido generalizando los medios líquidos, cuyo inconveniente es que tienen mayores tasas de contaminación (el 8-10 frente al 3-5%). En cualquier caso, su demora sigue siendo excesiva para la toma de decisiones clínicas. ⁽⁶⁶⁾

Los medios de cultivo que se utilizan en los Laboratorios que efectúan aislamiento de micobacterias en la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis de Bolivia, son medios sólidos a base de huevo, Lowenstein Jensen, Stonebrink y Ogawa, estos son preparados a partir de sales y siguiendo procesos bien establecidos para asegurar la calidad

.

(11)

Aunque el cultivo se ha considerado siempre la técnica de referencia del diagnóstico de la TB, hay que tener presente que algunos casos con baciloscopia positiva pueden tener un cultivo negativo por pérdida de viabilidad de los bacilos o por el proceso de

decontaminación de la muestra. Por otra parte, pueden producirse contaminaciones del laboratorio que den lugar a falsos positivos. Todo ello, sin embargo, no invalida el papel principal del cultivo en el diagnóstico y seguimiento de la TB. ⁽⁶⁶⁾

Utilidad del Cultivo:

Mediante el cultivo es posible incrementar la confirmación del diagnóstico de TB en aproximadamente 15-20% del total de casos y en 20-30% de los casos de TB pulmonar. ⁽¹⁰⁾

Por su sensibilidad y capacidad permite demostrar la viabilidad de los bacilos en todas sus formas, siendo la única herramienta que permite demostrar la curación del paciente en el seguimiento del tratamiento de TB pulmonar. Permite realizar estudios de investigación epidemiológica. Es el método de referencia con el que se debe evaluar nuevos métodos diagnósticos. ⁽¹¹⁾

La mejor muestra para coloración y cultivo de *M. tuberculosis* es el esputo recién expectorado. Las muestras de esputo a las 24 horas posteriores a la toma se encuentran invadidas a menudo por flora de la boca, y su utilidad es mucho menor; si el paciente no está produciendo expectoración de manera espontánea, el mejor ejemplar para estudio será el esputo inducido. ⁽⁴⁴⁾

7.7. MODS (Susceptibilidad a fármacos mediante observación microscópica)

El MODS, es un método de diagnóstico rápido basado en un cultivo en medio líquido que detecta *M. tuberculosis* y evalúa la susceptibilidad frente a los anti microbacterianos de primera línea isoniacida y rifampicina directamente desde muestras de esputo. ⁽⁷⁸⁾ Desarrollado en la Universidad Peruana Cayetano Heredia por Luz Caviedes y Robert Gilman mientras trabajaban en indicadores de reducción colorimétrica. Cuando Caviedes examinaba cultivos en una placa de 24 pozos, empleando un microscopio óptico

de luz invertida, pudo claramente identificar colonias de *M. tuberculosis* en el medio líquido mucho tiempo antes de que el crecimiento afectara las propiedades colorimétricas del mismo, Gilman reconoció de inmediato la potencial utilidad de este hallazgo para el desarrollo de un ensayo diagnóstico.⁽¹⁴⁾

Esta prueba está dirigida específicamente hacia países en vías de desarrollo, a fin de brindar alta especificidad y sensibilidad en el diagnóstico a un precio menor aproximadamente 2 \$us, con una metodología de relativa simplicidad, recientemente revisada en la cual se han desechado todas las redundancias de la metodología original.⁽⁷⁹⁾

Su empleo se sustenta en tres principios importantes: 1) *M. tuberculosis* crece más rápido en medio líquido que en medio sólido; 2) la posibilidad de la visualización de los cultivos (microcolonias) en forma de cordón en medio líquido bajo un microscopio invertido en una etapa temprana empleando un microscopio óptico de luz invertida y una placa de 24 pozos conteniendo muestras de esputo decontaminadas y resuspendidas en caldo Middlebrook 7H9 suplementado se puede examinar y detectar las microcolonias en un promedio de 7 días, y este es mucho más rápido que la detección del crecimiento macroscópico de las colonias en medio sólido; y 3) que la incorporación de las drogas isoniazida y rifampicina permite una rápida y directa detección de sensibilidad en forma concomitante con la observación del crecimiento bacteriano.⁽⁸⁰⁾

La simplicidad de la técnica, la gran sensibilidad del medio líquido frente al medio sólido para la detección de TB, la especificidad del 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 las mayores ventajas de este método.⁽⁸¹⁾

7.7.1. ANTECEDENTES DEL MODS

El descubrimiento de las características de la detección del crecimiento de *M. tuberculosis* que llevó al desarrollo del MODS se atribuye al trabajo de Luz Caviedes bajo la supervisión de Robert Gilman en sus laboratorios en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.⁽⁸²⁾

La evaluación del método MODS, así bautizado por el Dr. Gilman, se inició a mediados de 1997 con la idea de usar directamente la muestra biológica en un medio de cultivo líquido, porque los resultados mostraban que el cultivo en medio líquido MGIT (Mycobacteria growth indicator tube) (comercial) era mucho más rápido y sensible que el medio sólido de Middlebrook 7H11. Estos dos últimos métodos eran usados regularmente en el laboratorio para evaluar su rendimiento en el diagnóstico de TB como parte de los proyectos de investigación. Pero la desventaja del medio MGIT era el costo elevado. Otra prueba que se estaba utilizando al mismo tiempo era el método colorimétrico denominado MABA (Ensayo de Microplacas con Azul de Alamar) para determinar la susceptibilidad a drogas usando cultivos de *M. tuberculosis*, este método consistía en cultivar *M. tuberculosis* en medio líquido y evaluar su crecimiento agregando el colorante Azul de Alamar; el cual al cambiar de color indicaba desarrollo de las micobacterias.⁽⁸³⁾

La sugerencia de Dr. Gilman fue evaluar el uso del colorante Azul de Alamar para la prueba del cultivo líquido usando muestras de esputo. Se estructuró la prueba inicialmente solo para detección de crecimiento de *M. tuberculosis*. Durante el avance del estudio el colorante no era tan sensible para detectar el crecimiento de *M. tuberculosis*, en comparación con MGIT; la demora era de semanas para que el colorante cambie de color;

pero por curiosidad se había aprendido a detectar el crecimiento de microcolonias de *M. tuberculosis* observando los cultivos de MABA bajo el microscopio invertido.⁽⁸³⁾

Esta experiencia fue usada por Luz Caviedes para evaluar la detección microscópica de las microcolonias de *M. tuberculosis* en cultivo líquido a partir de muestras de esputo y paralelamente evaluar el rendimiento del colorante para detectar el crecimiento de *M. tuberculosis*. Los resultados fueron muy alentadores, la observación microscópica era mucho más rápida que el uso de colorante; tan rápida como el medio comercial MGIT. La detección era 100% específica, pues el crecimiento de *M. tuberculosis* era muy característico y podía claramente distinguirse del sedimento que propiamente contiene la muestra de esputo, de bacterias y de hifas de hongos contaminantes.⁽⁸³⁾

El año 2000 se realizó la evaluación del rendimiento del método MODS comparando en formas ciega con el cultivo MGIT y con el tradicional Lowenstein Jensen; así como también evaluaron la susceptibilidad a drogas de primera línea. Luego, en el 2003 se inició la validación del método a cargo de David Moore.⁽⁸³⁾ Tuvieron que pasar 8 años luego de la primera publicación del método en el 2000 para que los propios peruanos reconozcamos lo que realmente representa esta prueba (antes ya había sido reproducida por Brasil, Honduras, Vietnam, India, y países de África). El 2009, MODS o Método de Caviedes es respaldado por la Organización Mundial de la Salud, por la gran evidencia a nivel mundial que reafirman los hallazgos de Luz Caviedes.

La progresiva implementación del MODS por los Laboratorios de Referencia Nacional del Perú por parte del Programa Nacional de Control de la Tuberculosis (PNCT) tiene el fin de optimizar el desarrollo de este método más aun en aquellos lugares con recursos limitados.⁽⁸²⁾

7.7.2. CAMPO DE APLICACIÓN

El método es aplicado en los laboratorios que han realizado la validación, como un método rápido de tamizaje para la detección de resistencia a isoniacida y rifampicina en muestras de esputo de pacientes con TB pulmonar que aún no hayan iniciado tratamiento antituberculosis, pacientes nunca tratados, recaídas o abandonos recuperados con frotis positivo o negativo (número exacto de bacilos ácido alcohol resistente, +, ++ o +++).⁽⁸⁴⁾

7.8. TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

La TB es una enfermedad que se puede tratar y curar. Los medicamentos de primera elección que son básicos en todo tratamiento contra la tuberculosis son :⁽⁸⁵⁾

- Isoniacida (H)
- Rifampicina (R)
- Pirazinamida (Z)
- Etambutol (E)
- Estreptomina (S)

El tratamiento debe ser asociado ya que utiliza varios medicamentos a la vez, es prolongado porque dura 6 meses y está dividido en fases, dependiendo del esquema de tratamiento (Cuadro 4). El tratamiento es controlado ya que requiere exámenes periódicos de baciloscopía, y es supervisado porque la ingesta de medicamentos es directamente observada por el personal de salud o un agente comunitario.⁽⁸⁶⁾

Atendiendo a las bases bacteriológicas, para obtenerla curación de la TB el régimen terapéutico dura 6 meses.

	Esquema I	Esquema II	Esquema III
Fases	Nº de dosis y medicamentosa	Nº de dosis y medicamentosa	Nº de dosis y medicamentosa
Primera	52 dosis (2 meses) de administración diaria con rifampicina, isoniacida, pirazinamida y etambutol (excluyendo domingos)	52 dosis (2 meses) de administración diaria (excluyendo domingos) con rifampicina, isoniacida, pirazinamida, estreptomycin y etambutol	52 dosis de administración diaria (excluyendo domingos) con rifampicina, (jarabe previamente agitado), o de tabletas de rifampicina asociada a isoniacida y tabletas de pirazinamida (asegurándose de administrar las dosis correctas).
Segunda	104 dosis (4 meses) de administración diaria con rifampicina e isoniacida (excluyendo domingos)	26 dosis (1 mes) de administración diaria (excluyendo domingos) con rifampicina, isoniacida, pirazinamida y etambutol.	104 dosis de administración diaria (excluyendo domingos) con rifampicina e isoniacida.
Tercera		130 dosis (5 meses) de administración diaria (excluyendo domingos) con rifampicina, isoniacida y etambutol	

CUADRO 4. Esquemas terapéuticos para la tuberculosis

Fuente: Equipo Técnico PNCT y PRCT's Manual de normas técnicas en tuberculosis.

La estrategia DOTS (del inglés Directly Observed Treatment o Tratamiento Directamente Observado) es una de las intervenciones con mayor rendimiento costo - efectividad (grandes logros en salud con intervenciones de bajo costo) en la atención primaria, representando la principal estrategia del PNCT. Resume un conjunto de acciones políticas y operativas destinadas a curar a las personas enfermas con tuberculosis. Está constituida por 5 componentes: ⁽²⁴⁾

- Compromiso político: que garantice la ejecución de actividades del PNCT en forma continua y a largo plazo.
- Detección de casos por baciloscopia de esputo: a través de una búsqueda de casos sospechosos (SR) en todos los servicios de salud y diagnóstico por baciloscopia de esputo con calidad y oportunidad.

- Tratamiento acortado normatizado y estandarizado: para todos los casos nuevos y previamente tratados, con observación directa de la toma de la medicación en todas sus fases por personal sanitario o comunitario especialmente entrenado, monitoreando los diferentes esquemas; la dosis de los medicamentos antituberculosos y los efectos colaterales que pueden causar reacciones adversas (RAFAS).
- Disponibilidad regular e ininterrumpida de todos los medicamentos esenciales: a disposición de todos los servicios de salud en forma oportuna.
- Sistema normatizado de registro e información: que permite la evaluación, supervisión y monitoreo del Programa a diferentes niveles.

8. FUNDAMENTO DE LOS MÉTODOS

8.1. FUNDAMENTO DE LA TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN

Las paredes celulares de ciertas bacterias contienen ácidos grasos (Ácidos Micólicos) de cadena larga (50 a 90 átomos de carbono) que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con colorantes básicos. Por esto se denominan ácido-alcohol resistente. Las micobacterias como *M. tuberculosis* y *M. marinum* se caracterizan por sus propiedades de ácido-alcohol resistencia. La coloración clásica de Ziehl-Neelsen requiere calentamiento para que el colorante atraviese la pared bacteriana que contiene ceras. Al suspender el calentamiento y enfriar con agua, provoca una nueva solidificación de los ácidos grasos de modo que el colorante ya no puede salir de las bacterias. Por otro lado, el calentamiento aumenta la energía cinética de las moléculas del colorante lo cual también facilita su entrada a las bacterias. Las bacterias que resisten la decoloración son de color rojo y las que no, se ven de color azul ya que se utiliza azul de metileno como tinción de contraste.⁽⁸⁷⁾

Los BAAR poseen una pared celular rica en lípidos y ácidos carboxílicos (ácido micólico) que tienen la propiedad de unirse excepcionalmente fuerte al colorante primario (fucsina fenicada) cuando se usa el calor como mordiente. Una vez que se forma este complejo colorante-pared, ni siquiera la acción conjunta del ácido y del alcohol puede deshacerlo, ya que las paredes retienen el colorante en forma "resistente".⁽⁸⁸⁾

8.2. FUNDAMENTO DEL CULTIVO EN MEDIO SOLIDO

8.2.1. CULTIVO LOWENSTEIN JENSEN

La formulación original del medio de cultivo Lowenstein Jensen fue desarrollada por Lowenstein que incorpora rojo congo y verde de malaquita para inhibir las bacterias no

deseadas. ^(89; 90) La versión de Jensen elimina el rojo congo y utiliza una concentración moderada de verde de malaquita para prevenir el crecimiento de la mayoría de los contaminantes que sobreviven después de la decontaminación de la muestra.

Los nutrientes de este medio basal, más los aportados por el agregado de la mezcla de huevos, constituyen un rico soporte para el crecimiento de una gran variedad de micobacterias. El verde de malaquita inhibe a gran parte de la flora acompañante. El glicerol sirve como una fuente de carbono y es favorable para el crecimiento del bacilo de la tuberculosis humana mientras que es desfavorable para el tipo bovino. ⁽⁹¹⁾ Agregando un 5% de NaCl (cloruro de sodio), se pueden seleccionar micobacterias tolerantes a la sal (cuadro 5). ⁽⁹²⁾

Cultivo Lowenstein Jensen	
Harina de papa	30.0 mg
Asparagina	3.6 mg
Fosfato monopotásico	2.4mg
Citrato de magnesio	0.6mg
Verde de malaquita	0.4mg
Sulfato de magnesio	0.24mg
Glicerol	7.5mg

Ingredientes para 367.5ml de agua des ionizada

CUADRO 5. Fórmula del Medio Lowenstein Jensen comercial

Fuente: Disponible en: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/CatNav.aspx?oid=7590&prodoid=C21

En el cuadro 6 se observa la fórmula del medio Lowenstein Jensen preparado artesanalmente, esta fórmula es aplicada en el INLASA, lugar del cual son repartidos estos medios a nivel departamental, a los diferentes hospitales pertenecientes a la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis.

Componente	Cantidad
Fosfato monopotásico	2,5g
Sulfato de magnesio	0,2g
Citrato de magnesio	0,6g
Asparagina	3,6g
Glicerol	12ml
pH final	3

CUADRO 6. Formula del Medio Lowenstein Jensen preparado artesanalmente

Fórmula para 600ml de agua desionizada. Esterilizar a 121°C por 15min, dejar enfriar. Medir el volumen, por cada 600ml de tampón se coloca 1000ml de yema de huevo batida, más 20 ml de verde de malaquita.
Fuente: INLASA

8.2.2. CULTIVO STONEBRINK

Los nutrientes de este medio de cultivo constituyen un rico soporte para el crecimiento de *M. bovis*. El verde de malaquita inhibe el desarrollo de la flora acompañante

Gram positiva y de algunas bacterias Gram negativas (Cuadro 7).⁽⁹³⁾

			Lowenstein Jensen	Stonebrink	Ogawa	OgawaKudoh (ácido)
Solución salina	Fosfato monopotásico KH ₂ PO ₄	g	2,4	3,5	6	12
	Fosfato disódico HN ₂ PO ₄	g		1,6		
	Sulfato de magnesio SO ₄ Mg. 7H ₂ O	g	0,24			
	Citrato de Magnesio	g	0,6			0,6
	Glutamato de sodio	g			6	3
	Piruvato de sodio	g		6,25		
	L-asparagina	g	3,6			
	Glicerol	ml	12		36	24
	Agua destilada c.s.p	ml	600	500	600	600
Huevos	ml	1000	1000	1200	1200	
Verde de malaquita 2%	ml	20,0	20,0	36	24	
pH aproximado		6,8	6,8	6,8	6,2	

CUADRO 7. Formula de preparación de medios a base de huevo

Fuente: Barrera L. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis

8.2.3. CULTIVO OGAWA

El medio de Ogawa - Kudoh es uno de los medios recomendados como útiles a nivel clínico para aislamiento de *M. tuberculosis*. 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 no es selectivo para *M. tuberculosis* y por tanto otras micobacterias incluyendo algunas no patógenas pueden crecer en el mismo (Cuadro 7).⁽⁹⁴⁾

Método de decontaminación de Kudoh para medio Ogawa se fundamenta básicamente en la utilización de un medio de cultivo ácido de Ogawa que al sembrar directamente la muestra tomada con el hisopo y en contacto con el hidróxido de sodio (NaOH) 4% se neutraliza la acidez del medio.⁽¹¹⁾

8.3. FUNDAMENTO DEL ENSAYO MODS

El método se basa en la observación de cordones característicos de *M. tuberculosis* cuando crece en medio líquido, los cuales son visualizados tempranamente mediante el uso de un microscopio de luz invertida (ANEXO 1).

El método, ha sido diseñado para la detección del crecimiento de *M. tuberculosis*. 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.

El medio utilizado en el procedimiento MODS es el caldo base Middlebrook 7H9. El medio basal 7H9 contiene glicerol, biotina y citrato de sodio. El glicerol proporciona una fuente abundante de carbono y energía para los microorganismos tuberculosos. La biotina ayuda a estimular la reactivación de microorganismos dañados, además de participar en una

variedad de reacciones de carboxilación y descarboxilación. El citrato de sodio, cuando se convierte en ácido cítrico, contiene cationes inorgánicos en solución. ⁽⁹⁵⁾

El medio basal 7H9 se complementa con el complemento de enriquecimiento Middlebrook OADC. La complementación proporciona nutrientes necesarios para la proliferación micobacteriana. El complemento de enriquecimiento OADC contiene los siguientes aditivos requeridos: albúmina para proteger a los bacilos de Koch contra los agentes tóxicos; ácido oleico, un ácido graso utilizado en el metabolismo del microorganismo; cloruro de sodio para mantener el equilibrio osmótico; catalasa para destruir cualquier peróxido tóxico en el medio; y dextrosa como una fuente de energía. ⁽⁹⁵⁾

El antibiótico PANTA (una mezcla de antibióticos que contienen ácido nalidíxico, azlocilina, polomixina B, trimetoprima y anfotericina B) se agrega al caldo 7H9 enriquecido para suprimir la proliferación de contaminantes. ⁽⁹⁵⁾

8.4. FUNDAMENTO DE LA DECONTAMINACIÓN PREVIA

La recuperación de micobacterias a partir de esputos u otros especímenes que contienen mucosas contaminadas con otros organismos es difícil, ya que generalmente *Mycobacterium* crece mucho más lento que otras especies bacterianas. La decontaminación y digestión de las mucosas mata los componentes contaminantes de la flora normal y permite un mejor crecimiento lento de micobacteria para crecer sin la competencia de otras bacterias. ⁽⁹⁶⁾

Hidróxido de sodio (NaOH), en TB Base Digestant Red, actúa como un emulsionante y un decontaminante, rompiendo material mucoide e inhibiendo el crecimiento de contaminantes. Un indicador de pH se utiliza en el TB Base Digestant Red para asegurar que se mantenga el pH adecuado. TB Base Digestant Red permanecerá de

color rosa durante las etapas de decontaminación, y pasa a un color claro después que la solución ha sido neutralizada por la adición de ácido clorhídrico 1N (HCl).⁽⁹⁶⁾ N-acetil-L-cisteína (NALC), que es un agente mucolítico disminuye la viscosidad del esputo y favorecer la penetración del decontaminante (NaOH) que puede entonces ser utilizado a menor concentración y durante menos tiempo.⁽¹⁰⁾ Citrato de sodio, en TB Base Digestant Red, ayuda en la licuefacción por la unión de metales pesados, estabilizando así al NALC y permitiendo que funcione correctamente. Tampón fosfato disminuye la gravedad específica de la muestra y neutraliza suavemente la muestra después de la decontaminación.⁽⁹⁶⁾ La fórmula de la solución digestiva se encuentra en el cuadro 8.

TB Base Diagnostic Red 50ml	
NaOH (4%)	50%
Citrato de sodio (2.94%)	50%
Indicador de pH	0.1%
pH final 13.5+/- 0.5 a 25°C	
NALC	
N-Acetil-L-Cisteina	250mg

CUADRO 8. Composición de la solución digestiva

Fuente:https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/CatNav.aspx?oid=8187&prodoid=U22 (TB Prep Kit Red.)

8.5. PRUEBA DE TIPIFICACIÓN ESPECÍFICA: PRUEBA DE NIACINA

La niacina (ácido nicotínico) juega un rol vital en las reacciones de óxido-reducción que ocurren durante el metabolismo de todas las micobacterias. Aunque todas ellas producen niacina, la mayoría lo hace en cantidad moderada y la emplea en la síntesis de otras moléculas. Sólo *M. tuberculosis* la produce muy activamente y la acumula en gran cantidad porque no puede procesarla posteriormente.⁽¹⁰⁾

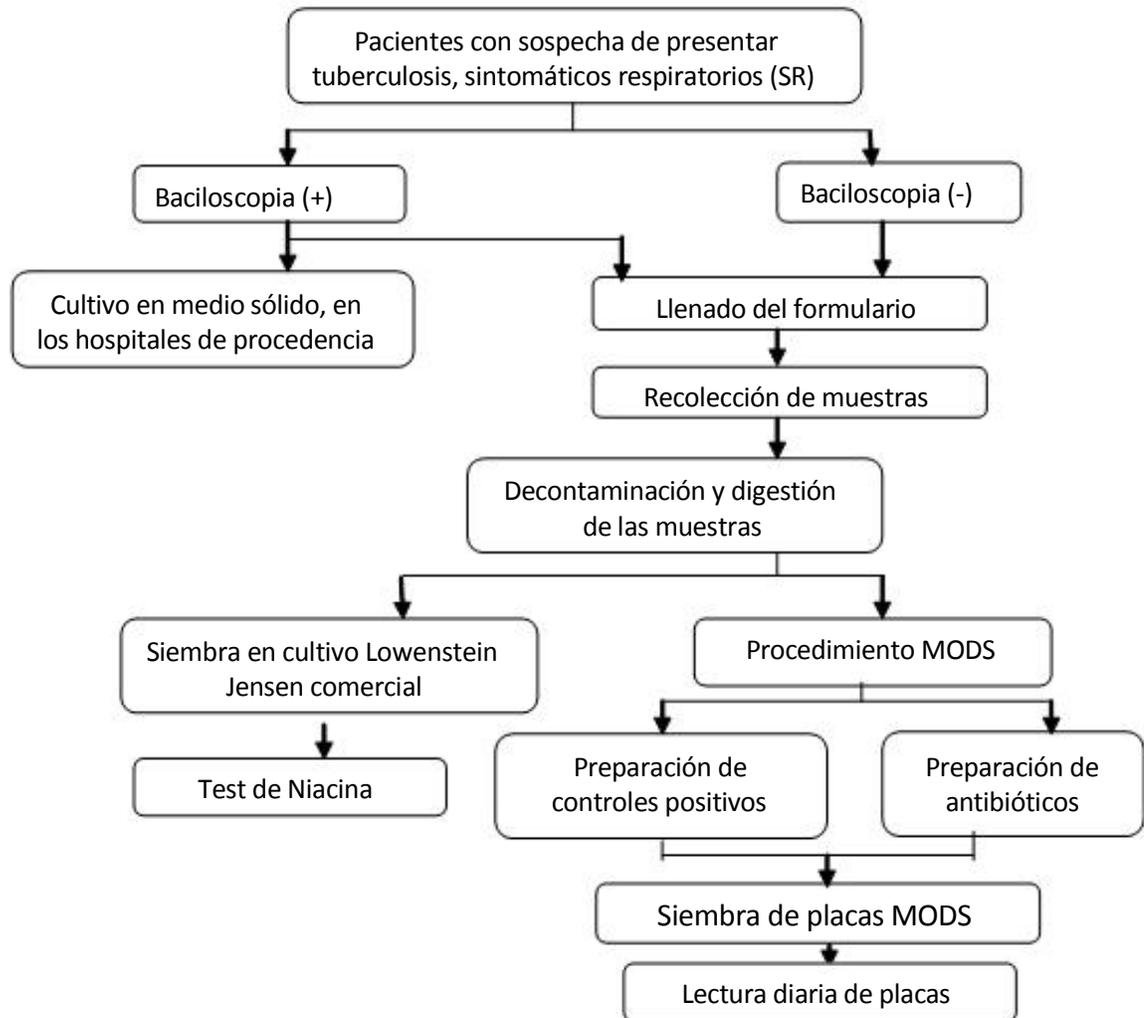
La niacina es excretada al medio, sobre todo en medios con base de huevo, del cual puede ser extraída y detectada. La acumulación de niacina puede ponerse en evidencia con mayor seguridad luego de 3-4 semanas de la aparición de las colonias y cuando el desarrollo es abundante (más de 50 colonias). Si se observa desarrollo abundante en más de un tubo sembrado con una muestra de un paciente, para agilizar el diagnóstico la prueba puede ser realizada cuando se detecta el cultivo positivo. Pero es necesario considerar que el resultado puede ser resultar negativo porque el cultivo es muy joven y aún no se ha acumulado suficiente cantidad de ácido nicotínico en el medio. Ante un resultado negativo de un cultivo joven, es necesario repetir la prueba con otro tubo incubado hasta las 3-4 semanas. ⁽¹⁰⁾

Está descrito que excepcionalmente *M. simiae* y *M. chelonae* pueden tener resultado positivo con la prueba de niacina. Es poco frecuente que así sea y, de todas formas, la primera especie se distingue de *M. tuberculosis* porque evidencia pigmentación amarilla y la segunda porque desarrolla rápidamente. ⁽¹⁰⁾

Las tiras de papel comerciales están impregnadas con cloramina y tiocianato potásico acidificado, y liberan cloruro de cianógeno, el cual reacciona con PAS (ácido para - amino salicílico) y produce un color amarillo en presencia de niacina. Si no ésta, no se produce color. Una prueba de niacina positiva en un cultivo de micobacterias no cromogénicas con colonias rugosas (en miga de pan) y de crecimiento lento, aislado en una muestra clínica es prácticamente diagnóstico de *M. tuberculosis*. La intensidad de la reacción depende de la cantidad de crecimiento en el cultivo presente. ⁽⁶²⁾

9. METODOLOGIA

9.1. FLUJOGRAMA DE ESTUDIO



9.1.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

La recolección de muestras de esputo de pacientes sintomáticos respiratorios, se realizó en diferentes centros de salud: Instituto Nacional del Torax, Hospital Municipal de Caranavi, Hospital Boliviano Holandes, Hospital de Clínicas, Hospital Corea y Hospital Materno Infantil Los Andes. Se recolecto una muestra por paciente.

Las muestras de esputo, fueron recolectadas con su respectivo resultado de baciloscopia, la cual fue realizada en el respectivo laboratorio de procedencia, y además se realizó el llenado de un formulario, para obtener todos los datos necesarios para el estudio.

Se verifico que todas las muestras estén en un envase adecuado y etiquetados correctamente. Además se verifico la fecha de recolección de la muestra, priorizando a las muestras con dos días o menos de recolección. En el caso de una muestra con más de tres días de recolección, se preguntó si la muestra estaba en refrigeración durante ese tiempo.

9.1.2. CULTIVO EN MEDIO SOLIDO DE LOS RESPECTIVOS CENTROS DE SALUD

En el caso de las muestras con baciloscopia positiva, se verifico antes de recogerlas, que estas muestras hayan sido llevadas a cultivo en los Centros de salud de procedencia. El cultivo en estos laboratorios se realizó en medio Lowenstein Jensen, Stonebrink, Ogawa, dependiendo de la técnica que emplea el laboratorio.

9.1.3. DECONTAMINACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se utilizó una alícuota de 2ml de la muestra, a la cual se le agregó el mismo volumen de solución digestiva (NaOH, citrato de sodio-NALC) (ANEXO 2), se mezcló durante 30 segundos en vortex y se dejó reposar unos 15 a 20 minutos. Se le agrego PBS (tampón fosfato) pH 6,8 (ANEXO 3) hasta un volumen de 13ml. Se llevó a centrifugar a 3000g durante 15 minutos, luego se decantó el sobrenadante y se agregó gotas de ácido clorhídrico (HCl) 1M

9.1.4. SIEMBRA EN MEDIO LOWENSTEIN JENSEN COMERCIAL

Se re suspendió el sedimento y se sembró 2 gotas en un medio Lowenstein Jensen comercial (ANEXO 4). Luego se llevó a incubar a 37°C, con la tapa semi abierta y el tubo

inclinado durante 24 a 72 horas, pasado este tiempo se hizo parar los tubos, cerrando las tapas. Se realizó la primera lectura a partir del día 15, la segunda lectura al día 20 y a partir de ahí se realizó las lecturas cada 20 días; en el caso de observar desarrollo al día 15 o 20 se esperó hasta el día 40 para tener un desarrollo óptimo; en el caso de no observar desarrollo al día 40 se esperó hasta el día 60 para reportar como un cultivo negativo.

9.1.5. TEST DE NIACINA

En el caso de observar un abundante desarrollo de colonias (en el mejor de los casos colonias eugónicas), se realizó el test de niacina. Para lo cual se agregó al cultivo LJ comercial y a un cultivo procedente del INLASA, 1,5ml de agua estéril, inclinando los tubos, se llevó a incubar a 37°C durante 30 minutos. Se trasvaso el líquido a otro tubo con tapa rosca, y se colocó una tira de análisis de ácido nicotínico para TB (ANEXO 5), transcurridos unos 15 minutos se procedió a comparar el color de los extractos (ANEXO 6), entre el cultivo procedente del INLASA y ante un control negativo, el cual consiste en agua estéril más la tira de análisis de ácido nicotínico para TB.

9.1.6. TINCIÓN ZIEHL NEELSEN

En el caso de observar un escaso desarrollo en el cultivo LJ comercial se procedió a realizar la tinción Ziehl Neelsen. Para lo cual se realizó un frotis de las colonias, luego se aplicó al frotis fucsina-fenicada, se procedió a calentar la placa hasta observar los tres vapores, luego se lavó la placa con agua, para luego agregarle alcohol-ácido y dejar con el mismo durante un minuto (hasta dejar de observar la coloración roja), luego se procedió a lavar con agua, se agregó el colorante azul de metileno y se dejó con el mismo durante 3-5 minutos. Se lavó la placa con agua y se dejó secar, para luego observar con el objetivo de inmersión.

9.1.7. PROCEDIMIENTO MODS

Luego de la decontaminación de la muestra se procedió a agregar 1ml del cultivo Middlebrook de los frascos con tapa blanca, correspondientes a las muestras (previamente a estos frascos se les agrego 100ul de PANTA, la preparación de la misma se explica más adelante), se resuspende el sedimento y se tomó 0.5ml del resuspendido y se lo almaceno en un criotubo de 1ml, para luego llevarlo a congelación (ANEXO 7), esto corresponde al back up de la muestra.

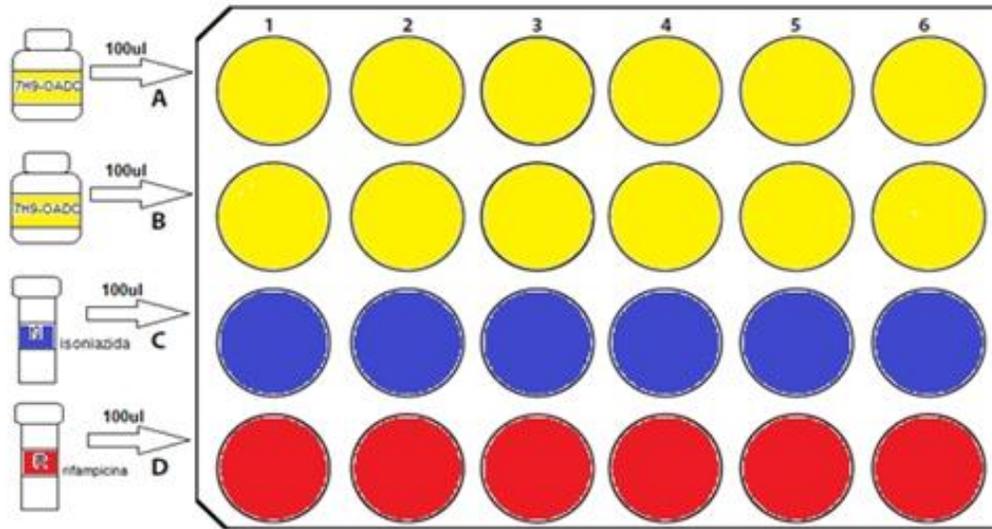
9.1.7.1. PREPARACIÓN DE CONTROLES POSITIVOS

Se trabajó con cepas caracterizadas en el INLASA, se utilizó una cepa sensible (ATCC), una cepa resistente a isoniacida y una cepa resistente a rifampicina. Se trasladaron colonias del medio a un tubo de TB Diluting Fluid que contenía perlas, se agitaron los tubos en vortex hasta diluir por completo las colonias. Luego se agregó el contenido a otro tubo que contenía agua y Tween (ANEXO 8), ajustando a una turbidez estándar de McFarland (ANEXO 9) de látex N°1(3×10^6 UFC/ml). Se agregó 5ul de la suspensión de cepa a frascos que contiene caldo base Middlebrook 7H9.

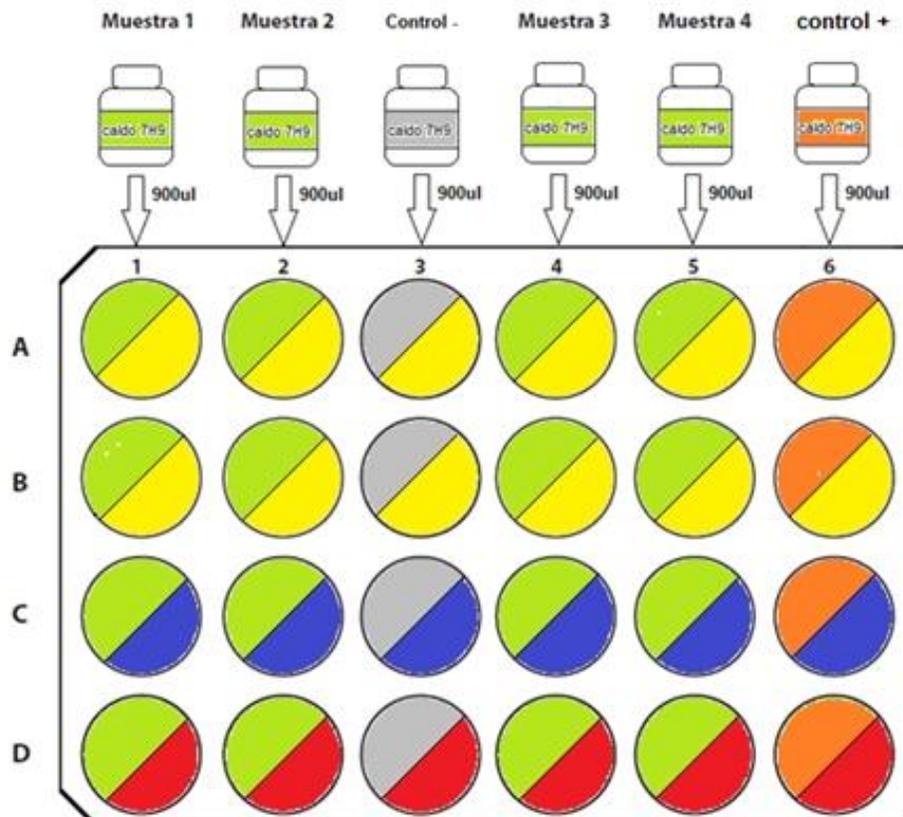
9.1.7.2. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES ANTIBIOTICAS

Para la preparación de los antibióticos se utilizó tres frascos, uno con la letra I impresa, otro con la letra R impresa y otro con la letra N impresa, cada uno correspondía a: isoniacida, rifampicina y PANTA respectivamente (ANEXO 10). Se reconstituyeron los antibióticos en estos frascos que contenían agua des ionizada.

9.1.7.3. SIEMBRA DE PLACAS MODS



Se sembró 100ul del 7H9-OADC, INH y RIF, a los respectivos pozos



Se sembró 900ul del caldo 7H9 con las muestras, el control negativo y el control positivo, a los respectivos pozos

Luego se sellaron las placas con tapas de silicona y fueron colocadas en bolsas ziplock (ANEXO 11), para luego ser llevadas a incubación a 37°C.

9.1.7.4. LECTURA DIARIA DE PLACAS

Pasados los 5 días después de la siembra, se procedió a iniciar la lectura de las placas con la ayuda de un microscopio de luz invertida. Se realizó la lectura de las placas hasta observar desarrollo en los pozos sin droga, indicando como positivo al observar el desarrollo de las comas características de *M. tuberculosis*, se continuo las lectura de las placas positivas para observar la formación de los cordones característicos (ANEXO 12). En el caso de no observar desarrollo se realizó la lectura diaria hasta llegar al día 21, si hasta ese día no se observó el desarrollo de las comas, se reportó como muestra negativa. Se reportó como indeterminado en el caso de observar desarrollo solo en un pozo sin droga. Se reportó como contaminado en el caso de observar el desarrollo solo de hongos o alguna otra bacteria diferente.

9.2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Test diagnostico

9.3. CONTEXTO Y LUGAR

Se obtuvieron muestras de esputo de sintomáticos respiratorios (SR) en el Instituto Nacional del Torax, Hospital Municipal de Caranavi, Hospital Boliviano Holandes, Hospital de Clínicas, Hospital Corea y Hospital Materno Infantil Los Andes. Ubicados en la ciudad de La Paz, ciudad de El Alto y en Caranavi. Las muestras obtenidas correspondieron a la demanda natural de los referidos laboratorios de diagnóstico de TB. No fue requerida ninguna muestra biológica extra por causa de este estudio, siendo aprovechado el mismo material usado en el diagnóstico de rutina del Programa Nacional

de Tuberculosis de Bolivia. No hubo ningún tipo de contacto del equipo investigador con los pacientes, con el fin de obtener información.

9.3.1. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

Documento adjunto (ANEXO 13)

9.3.2. TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de muestra para el estudio comparativo de técnicas de diagnóstico fue de 150 muestras de esputo: 75 muestras con baciloscopia positiva y 75 con baciloscopia negativa.

9.3.3. MUESTRAS EN ESTUDIO

Muestras de esputo de individuos sintomáticos respiratorios que acudan al Instituto Nacional del Torax, Hospital Municipal de Caranavi, Hospital Boliviano Holandes, Hospital de Clínicas, Hospital Corea y Hospital Materno Infantil Los Andes.

Criterios de inclusión: Muestras de esputo de sintomáticos respiratorios (individuos con tos por más de 2 semanas) mayores de 14 años, que presenten baciloscopia del esputo positiva o negativa.

Criterios de exclusión: Individuos que manifiesten ser menores de 14 años. Pacientes con antecedente de inicio de tratamiento. Paciente con control de tratamiento

Criterios de eliminación: aquellas muestras contaminadas, tuberculosis atípica, muestras mal almacenadas.

9.3.4. RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

La información de los individuos se obtuvo a partir de los formularios patrón llenados por los propios centros de diagnóstico que colaboraron en el trabajo. Un formulario del proyecto (ANEXO 13) fue llenado con los resultados de la baciloscopia y

del cultivo (Lowenstein Jensen, Stonebrink y Ogawa), que fueron realizados por los propios centros de diagnóstico según protocolos aprobados por el PNCT.

La obtención de muestra biológica respiratoria fue de al menos 2ml de esputo. Para almacenar los datos sobre las variables y los resultados del test se creó una planilla con el programa Microsoft Excel 2013.

9.3.5. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se describió los resultados obtenidos en cada una de las técnicas diagnósticas mediante el número de casos observados y sus porcentajes. La estimación de la sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo de los test, sin prueba estándar de referencia, se realizará mediante un análisis de indicadores estadísticos básicos para evaluar el desempeño del procedimiento diagnóstico.

Para estimar la concordancia entre las diferentes técnicas diagnósticas de M. tuberculosis se utilizará el coeficiente de concordancia kappa.

Se analizaron los datos cuantitativos de los valores diagnósticos a través de tablas 2 x 2. El análisis de concordancia y chi-cuadrada se realizó con el programa Minitab 15. Los datos de las tablas 2x2 se introdujeron en el programa estadístico EPIDAT 3.0 y se realizó la determinación de los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos, también con la ayuda de este programa se determinó la concordancia entre las técnicas de diagnóstico (con un nivel de confianza del 95%). Un valor P inferior a 0,05 se utiliza para indicar la significancia estadística.

10. RESULTADOS

De las 150 muestras (75 con baciloscopia positiva y 75 con baciloscopia negativa). Se obtuvo mediante MODS: 77 muestras positivas, 67 negativas, 4 contaminadas y 2 indeterminadas. Mediante el LJ comercial se obtuvo: 60 positivas, 55 negativas y 35 cultivos contaminados (Tabla 1). De las 75 muestras que fueron sembradas en el cultivo estandarizado por la Red Nacional Laboratorios de Tuberculosis, en los respectivos Centros de Salud, se reportaron: 67 cultivos positivos, 5 negativos y 3 contaminados (tabla 1).

	Baciloscopia	MODS	LJ comercial	Cultivo estandarizado *
TB positivo	75	77	60	67
TB negativo	75	67	55	5
Contaminado		4	35	3
Indeterminado **		2		

*Cultivo Estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis

**Se reportó como indeterminado en el caso de observar desarrollo solo en un pozo de los 4 pozos correspondientes a un paciente

TABLA 1. Resultados obtenidos mediante la baciloscopia, MODS, LJ comercial y cultivo estandarizado por la Red Nacional Laboratorios de Tuberculosis. Instituto SELADIS, enero a junio del 2013

10.1. CONCORDANCIA DEL ENSAYO MODS CON LA BACILOSCOPIA Y EL CULTIVO COMERCIAL

Siendo los resultados de la baciloscopia y cultivo variables de tipo cualitativo, nominal dicotómica expresada como presencia o ausencia del bacilo, se calculó el valor que expresa el grado en que estos dos métodos coincidieron con el ensayo propuesto en este estudio (MODS), aplicando el índice de concordancia kappa mediante el cual se obtuvieron los siguientes resultados:

Se realizó una tabla de contingencia con los resultados obtenidos mediante MODS y los resultados reportados por la baciloscopia (tabla 2). Obteniendo un Chi-cuadrada de

111,807 (valor $P < 0,05$). Lo cual nos indica que existe una dependencia entre los resultados obtenidos, por lo cual se podemos realizar el análisis de concordancia.

		BACILOSCOPIA		Total
		Positivo	Negativo	
MODS	Positivo	71	5	76
	Negativo	3	63	66
Total		74	68	142

TABLA 2. Distribución de muestras positivas y negativas mediante MODS y baciloscopia. A través de una tabla de contingencia. Instituto SELADIS, enero a junio del 2013.

Al determinar la concordancia del ensayo MODS ante la baciloscopia, se obtuvo una concordancia observada del 0,9437, una concordancia esperada del 0,5015 y un valor kappa de 0,8871. Según los Criterios de Landis y Koch, el valor kappa obtenido corresponde a una fuerza de concordancia casi perfecta entre el ensayo MODS y la baciloscopia (tabla 3).

Concordancia observada	0,9437
Concordancia esperada	0,5015
Valor kappa	0,8871
Fuerza de concordancia	Casi perfecta

TABLA 3. Valoración de la concordancia entre MODS y la baciloscopia aplicando índice kappa. Instituto SELADIS, enero a junio del 2013

Se realizó una tabla de contingencia con los resultados obtenidos mediante MODS y LJ comercial (tabla 4). Obteniendo un Chi-cuadrada de 109,000. (Valor $P < 0,05$). Lo cual nos indica que existe una dependencia entre los resultados obtenidos, por lo cual proseguimos con el análisis de concordancia.

		LJ comercial		Total
		Positivo	Negativo	
MODS	Positivo	60	0	60
	Negativo	0	49	49
Total		60	49	109

TABLA 4. Distribución de muestras según positividad y negatividad mediante MODS y cultivo LJ comercial. Instituto SELADIS, enero a junio del 2013

Se obtuvo además un 100% de concordancia ante el cultivo Lowenstein Jensen comercial, ya que se obtuvo una concordancia observada del 1, una concordancia esperada del 0,5051 y un valor kappa de 1, que según los Criterios de Landis y Koch, el valor kappa obtenido corresponde a una fuerza de concordancia casi perfecta entre el ensayo MODS y el cultivo Lowenstein Jensen comercial (tabla 5).

Concordancia observada	1
Concordancia esperada	0,5051
Valor kappa	1
Fuerza de concordancia	Casi perfecta

TABLA 5. Valoración de la concordancia entre MODS y el cultivo Lowenstein Jensen comercial, aplicando índice kappa. Instituto SELADIS, enero a junio del 2013

10.2. SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DEL MODS FRENTE A LA BACILOSCOPIA

Al realizar la comparación entre MODS y la baciloscopia, a partir de los datos reportados en la tabla 2, el ensayo MODS obtuvo una sensibilidad de 0,96 (96%), una especificidad de 0,93 (93%), con un valor predictivo positivo del 93% y un valor predictivo negativo del 95% (tabla 6).

TASAS	MODS
Sensibilidad	96%
Especificidad	93%
VPP	93%
VPN	95%

VPP: valor predictivo positivo
VPN: valor predictivo negativo

TABLA 6. Tasas de evaluación del MODS frente a la baciloscopia. Instituto SELADIS, enero a junio del 2013.

El ensayo MODS con una sensibilidad de 0.96 identificará correctamente al 96% de los casos verdaderos positivos y con una especificidad de 0.93 identificará correctamente al 93% de los casos verdaderamente negativos.

El valor predictivo positivo obtenido de 0.93 significa que si se obtiene un resultado positivo con el MODS, existe un 93% de probabilidad de que el paciente evidentemente tenga la enfermedad.

El valor predictivo negativo obtenido de 0.95 significa que ante un resultado negativo del MODS existe una probabilidad del 95% de que la enfermedad esté ausente.

10.3. SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALORES PREDICTIVOS DEL MODS FRENTE AL CULTIVO EN LOWENSTEIN JENSEN COMERCIAL

El estudio comparativo del ensayo MODS utilizando al cultivo Lowenstein Jensen comercial como prueba de referencia, a partir de los resultados obtenidos en la tabla 4, presento una sensibilidad de 1 (100%) y una especificidad de 1(100%), con un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 100% (tabla 7).

TASAS	MODS
Sensibilidad	100%
Especificidad	100%
VPP	100%
VPN	100%

VPP: valor predictivo positivo
VPN: valor predictivo negativo

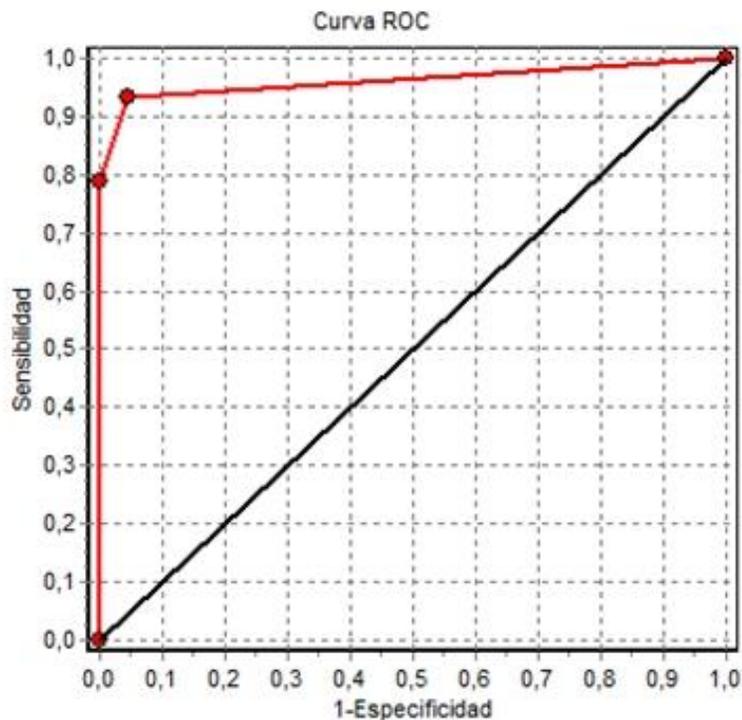
TABLA 7. Tasas de evaluación del MODS frente al cultivo Lowenstein Jensen comercial. Instituto SELADIS, enero a junio del 2013

El ensayo MODS con una sensibilidad de 1 identificará correctamente al 100% de los casos verdaderos positivos y con una especificidad de 1 identificará correctamente al 100% de los casos verdaderamente negativos.

El valor predictivo positivo obtenido de 1 significa que si se obtiene un resultado positivo con el MODS, existe un 100% de probabilidad de que el paciente evidentemente tenga la enfermedad.

El valor predictivo negativo obtenido de 1 significa que ante un resultado negativo del MODS existe una probabilidad del 100% de que la enfermedad esté ausente.

Al realizar la relación entre las pruebas diagnóstico: baciloscopia, MODS y cultivo LJ comercial; recurriendo a la curva ROC o curva de rendimiento diagnóstico. Con un nivel de confianza del 95% se obtuvo un área bajo la curva (AUC) de 0,9623. Lo cual indica que existe un 96% de probabilidad de que el ensayo MODS detecte correctamente a las personas con TB (grafica 1).



GRAFICA 1. Relación entre la baciloscopia, el ensayo MODS y el cultivo LJ comercial, mediante la curva ROC. Instituto SELADIS, enero a junio del 2013

10.4 CONCORDANCIA ENTRE CULTIVO MICROBIOLÓGICO ESTANDARIZADO POR LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE TUBERCULOSIS Y EL ENSAYO MODS EN MUESTRAS CON BACILOSCOPIA POSITIVA

Se realizó una tabla de contingencia con los resultados obtenidos mediante MODS y LJ comercial (tabla 8) Obteniendo un Chi-cuadrada de 52,467. (Valor $P < 0,05$). Lo cual indicamos que existe una dependencia entre los resultados obtenidos, por lo cual se puede realizar el análisis de concordancia.

		Cultivo estandarizado		Total
		Positivo	Negativo	
MODS	Positivo	67	1	68
	Negativo	0	3	3
Total		67	4	71

TABLA 8. Distribución de muestras según positividad y negatividad mediante MODS y el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis. Instituto SELADIS, enero a junio del 2013

En la verificación de la concordancia entre el ensayo MODS y el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis (medios: Lowenstein Jensen, Stonebrink y Ogawa), a partir de 75 muestras con baciloscopia positiva, se obtuvo una concordancia observada del 0,9859, una concordancia esperada del 0,9062 y un valor kappa de 0,8497. Según los Criterios de Landis y Koch, el valor kappa obtenido corresponde a una fuerza de concordancia casi perfecta entre el ensayo MODS y el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis (tabla 9).

Concordancia observada	0,9859
Concordancia esperada	0,9062
Valor kappa	0,8497
Fuerza de concordancia	Casi perfecta

TABLA 9. Medición de la concordancia entre MODS y el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis. Instituto SELADIS, enero a junio del 2013

10.5. TIEMPO DE DETECCIÓN DEL CRECIMIENTO DE M. tuberculosis EN MODS Y EN CULTIVO LJ COMERCIAL Y EL CULTIVO ESTANDARIZADO POR LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE TUBERCULOSIS

10.5.1. PROMEDIO DE DÍAS EN LOS CUALES SE OBTUVIERON RESULTADOS POSITIVOS (DESARROLLO DE COLONIAS)

El tiempo transcurrido desde la fecha de inoculación (procesamiento de la muestra) a la fecha de disponibilidad de resultados positivos en MODS vario entre 5 y 16 días, con una mediana de 6 días.

El tiempo promedio del día de positividad (desarrollo de colonias) en el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis fue de 34 días y en el cultivo Lowenstein Jensen comercial el promedio fue de 23 días.

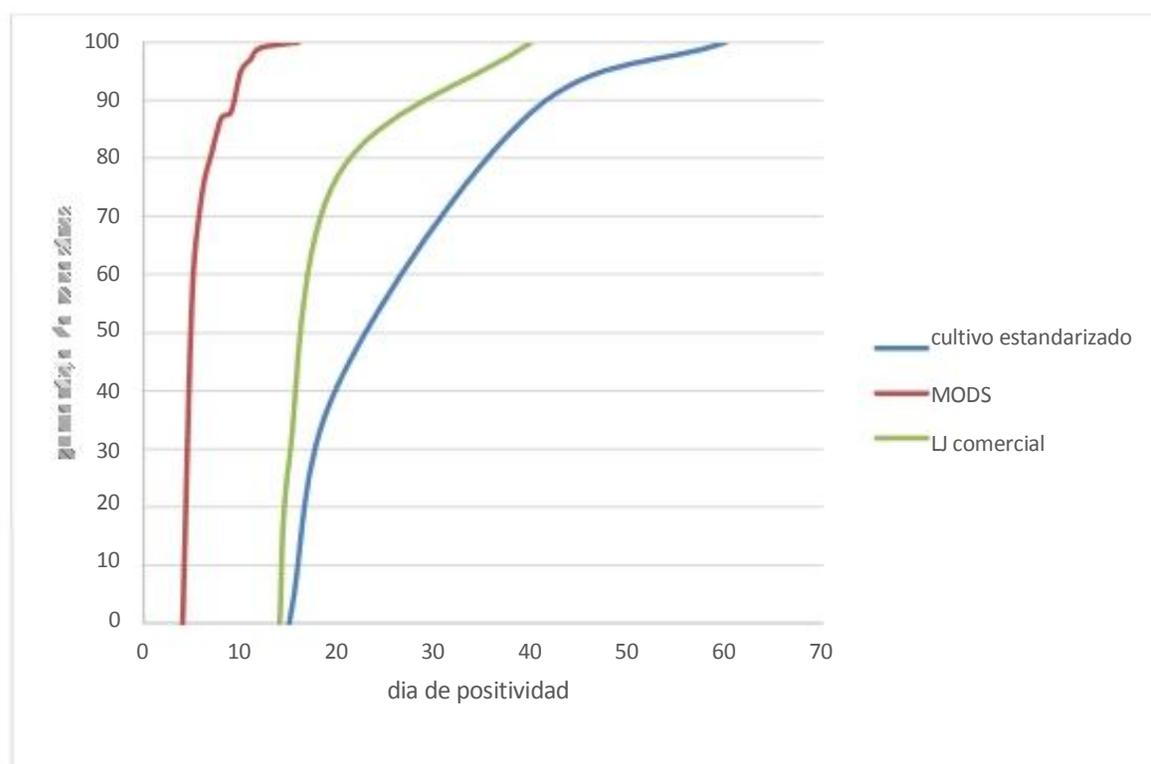
10.5.2. PORCENTAJE DE MUESTRAS QUE RESULTARON POSITIVAS EN RELACIÓN A LOS DÍAS DE CRECIMIENTO

De las 150 muestras recolectadas, 77 muestras dieron positivo en MODS, teniendo en cuenta a las 77 muestras como el 100% de muestras positivas; 5 días después de la siembra se obtuvo un 57% de los resultados positivos, al día 7 ya se contaban con el 81% de los resultados positivo, al día 12 se contaban con el 99%de resultados positivos y al día 16 ya se contaba con el 100% de los resultados positivos (grafica 2).

Del total de muestras recolectadas, 60 muestras dieron positivo en el cultivo LJ comercial, tomando en cuenta a las 60 muestras como el 100% de muestras positivas; al día 15 después de la siembra se obtuvieron el 28% de resultados positivos, al día 20 se obtuvo

el 77% de los resultados positivos y al día 40 ya se contaba con el 100% de los resultados positivos (grafica 2).

De las 75 muestras llevadas a cultivo en sus respectivos centros de salud, 68 muestras fueron reportadas como positivas en los cultivos estandarizados por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis. Tomando en cuenta las 68 muestras como el 100% de resultados positivos; al día 20 se contaba con el 41% de resultados, al día 40 se contaba con el 88% de resultados positivos y al día 60 ya se tenía el 100% de resultados positivos (grafica2).



GRAFICA 2. Porcentaje de muestras positivas por el ensayo MODS, cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorio de Tuberculosis y por el cultivo Lowenstein Jensen comercial, según el día de desarrollo de M. tuberculosis. Instituto SELADIS, enero a junio del 2013

10.5.3. PORCENTAJE DE MUESTRAS QUE RESULTARON POSITIVAS EN RELACIÓN AL GRADO DE POSITIVIDAD DE LA BACILOSCOPIA Y LOS DÍAS DE CRECIMIENTO

Entre las muestras que resultaron positivas en MODS, 23 muestras presentaban una baciloscopia de (+++), considerando a estas 23 muestras como un 100% de cultivos positivos, al día 5 se contaba con el 86% de los resultados y al día 6 ya se tenía el 100% de resultados positivos (grafica 3).

Del total de muestras positivas mediante el ensayo MODS, 16 muestras fueron reportadas con una baciloscopia de (++), considerando a las 16 muestras como un 100% de cultivos positivos, los porcentajes de cultivos positivos en los días 5, 6 y 10 fueron 69%, 94% y 100%, respectivamente (grafica 3).

Entre las muestras con resultados positivos en MODS, 20 muestras presentaban una baciloscopia de (+), considerando a las 20 muestras como el 100% de cultivos positivos, los porcentajes de cultivos que resultaron positivos en los días 5, 6, 7, 8, 10 y 11 fueron 50%, 60%, 75%, 80%, 95% y 100%, respectivamente (grafica 3).

Entre las muestras positivas mediante MODS, 8 muestras presentaban una baciloscopia de 1-9BAAR, considerando a las 8 muestras como el 100% de cultivos positivos. El porcentaje de cultivos que resultaron positivos en los días 6, 7, 8, 10, 11 y 16 fueron 12%, 25%, 62%, 75%, 87% y 100%, respectivamente (grafica 3).



GRAFICA 3. Porcentaje de muestras positivas en MODS, y día de positividad según el resultado de baciloscopia. Instituto SELADIS, enero a junio del 2013

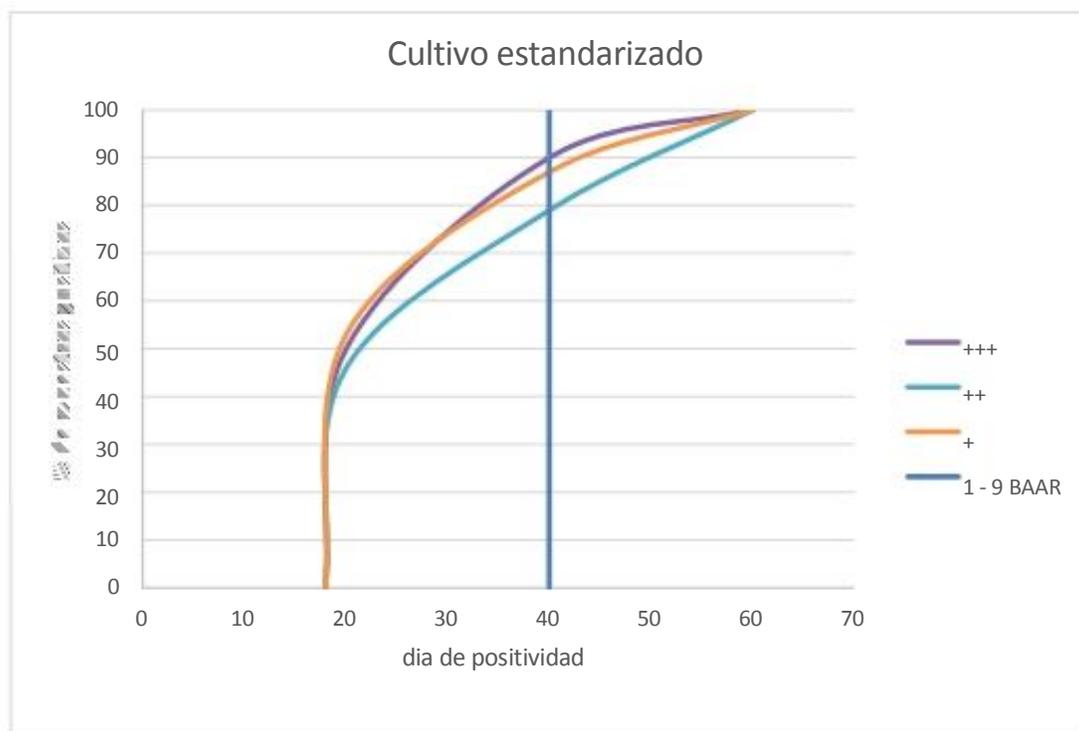
Entre las muestras que resultaron positivas mediante el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis, 20 muestras presentaban una baciloscopia de (+++), de estas 20 muestras (100%), el porcentaje de cultivos que resultaron positivos en los días 20, 40 y 60 fueron 50%, 90% y 100%, respectivamente (grafica 4).

Del total de muestras positivas en el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis, 13 muestras fueron registradas con una baciloscopia de (++), considerando a las 13 muestras como un 100% de cultivos positivos, el porcentaje de los cultivos con resultados positivos en los días 20, 40 y 60 fueron 46%, 79% y 100%, respectivamente (grafica 4).

Entre las muestras positivas en el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis, 15 muestras (100%) presentaban una baciloscopia de (+). El

porcentaje de los cultivos que resultaron positivos en los días 20, 40 y 60 fueron 53%, 87% y 100%, respectivamente (grafica 4).

Entre las muestras positivas mediante cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis, 7 muestras presentaban una baciloscopia de 1-9BAAR, los resultados de estas 7 muestras (100%) estaban disponibles al día 40 después de la siembra (grafica 4).



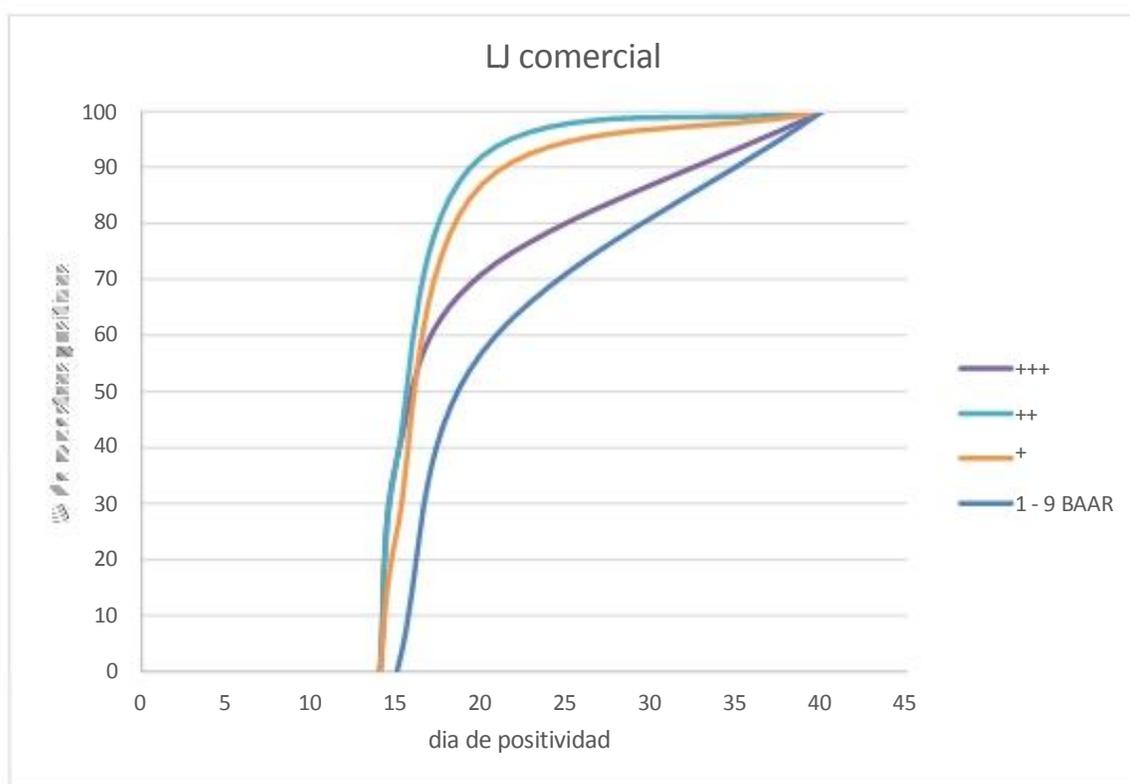
GRAFICA 4. Porcentaje de muestras positivas en cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis, y día de positividad según el resultado de baciloscopia. Instituto SELADIS, enero a junio del 2013

Del total de muestras con cultivo LJ comercial positivo, 21 muestras (100%) presentaba una baciloscopia de (+++), los porcentajes de los cultivos que resultaron positivos en los días 15, 20 y 40 fueron 38%, 71% y 100%, respectivamente (grafica 5).

Entre las muestras positivas en LJ comercial, 13 de las muestras (100%) presentaban una baciloscopia de (++). Los porcentajes de los cultivos que resultaron positivos en los días 15, 20 y 40 fueron 38%, 71% y 100%, respectivamente (grafica 5).

De las muestras con cultivo LJ comercial positivo, 16 muestras (100%) fueron reportadas baciloscopia (+). Los porcentajes de los cultivos que resultaron positivos en los días 15, 20 y 40 fueron 25%, 87% y 100%, respectivamente. (Grafica5).

Entre las muestras que resultaron positivas en el cultivo LJ comercial, 7 muestras presentaban una baciloscopia 1 a 9 BAAR en toda la lámina, el porcentaje de cultivos positivos a los días 20 y 40 fueron 57% y 100%, respectivamente (grafica 5).



GRAFICA 5. Porcentaje de muestras positivas en cultivo LJ comercial, y día de positividad según el resultado de baciloscopia. Instituto SELADIS, enero a junio del 2013

11. DISCUSIÓN

Uno de los factores más importantes que influyen en la actual epidemia de tuberculosis en los entornos con recursos limitados, es la pobreza, que está estrechamente relacionada con la malnutrición, el hacinamiento, la falta de acceso a los servicios de salud gratuitos y/o a precios accesibles, y la dependencia de los curanderos tradicionales que pueden facilitar la transmisión de la tuberculosis.

En los países con alta incidencia, el control de la tuberculosis se basa en métodos pasivos de detección de casos entre las personas que se presentan a los servicios de atención de salud en forma voluntaria, seguido por diagnóstico basado en los síntomas clínicos o diagnóstico de laboratorio mediante microscopía de esputo (baciloscopia). Para esto se requieren muestras de esputo en serie (una tomada en el acto y la segunda y tercera a la mañana siguiente), lo cual significa que a las personas se les pide hacer repetidas visitas al Centro de Salud para la entrega de muestras y posterior recojo de resultados. Para muchos pacientes, los gastos de visitas al Centro de Salud repetidamente son prohibitivos, y el abandono del paciente es un importante problema. Además, ha sido reportado que la sensibilidad de la baciloscopia de esputo por microscopía puede variar en un rango de 20 a 80%, a menudo dependiendo de muchos factores entre ellos: la diligencia con la que se recogen las muestras, como se realizan los frotis, y como se examinan los frotis teñidos que representan factores de sesgo muy grandes en el diagnóstico.⁽⁹⁷⁾

Por otro lado, la baciloscopia para TB en coinfectados con VIH y en niños, debido a la reducida carga bacilar pulmonar en estos pacientes es de muy baja sensibilidad.

⁽⁹⁸⁾ En países con pocos recursos, muchos laboratorios de baciloscopia se limitan a una habitación sencilla, con microscopios en mal estado, algunos de estos laboratorios incluso

carecen de fuentes coherentes de electricidad y agua potable. Hay pocas oportunidades para la formación del personal por tanto pocos profesionales capacitados para manejar grandes volúmenes de trabajo. Con una ausencia total de Programas de garantía de calidad (PGC), incluyendo el control de calidad y la evaluación externa de la calidad.

Como se mencionó a lo largo del trabajo, el ensayo MODS es una prueba rápida y relativamente simple, fue desarrollada recientemente en Perú. Esta nueva herramienta diagnóstica permite la detección eficaz, rápida y a bajo costo, del microorganismo responsable de la TB, aplicándola directamente en muestras de esputo. ^(14; 13)

Es importante puntualizar que en el presente estudio el análisis de test diagnóstico del ensayo MODS frente a la baciloscopia que NO es considerada como un método gold estándar es decir no es una prueba cuya efectividad esté establecida, con sensibilidad y especificidad cercanas al 100%, que se considera como estándar o patrón para el diagnóstico de una enfermedad. Sin embargo, como este procedimiento es el más ampliamente utilizado en nuestro medio y por la disponibilidad de datos ya que se lo realiza de rutina, se la debe tomar en cuenta para cualquier estudio de evaluación o comparación de nuevos métodos de diagnóstico para TB, es así que demostramos que el MODS frente a la baciloscopia tiene una sensibilidad del 96%, una especificidad del 93%, valor predictivo positivo del 93% y un valor predictivo negativo del 95%, datos que en términos estadísticos significan un muy alto rendimiento del ensayo propuesto.

Ya que si bien la baciloscopia es simple, económica accesible rápida, posee baja sensibilidad ya que del 30 a 40% de los pacientes con TB pulmonar cursan con baciloscopia negativa. Existen estudios que incluso aseveran que muchos casos de reporte

de falla en el tratamiento son debidos más bien a que la baciloscopia de control no es un buen método para determinar si persiste aún la enfermedad o no. ⁽⁹⁷⁾

En los países más desarrollados, el diagnóstico de rutina de la tuberculosis por baciloscopia se suele confirmar mediante el cultivo, seguido por la identificación de la cepa *M. tuberculosis* y pruebas de sensibilidad a los medicamentos (DST). Sin embargo, estos ensayos requieren un prolongado tiempo de incubación y son mucho más caros que la baciloscopia, ya que requiere de equipos especializados, personal altamente capacitado y un suministro confiable de agua y electricidad. En la actualidad, el cultivo de TB en los laboratorios de nuestro país y en los de países de escasos recursos en general a menudo carecen de una adecuada infraestructura y cuentan con equipos inadecuados u obsoletos y las medidas de bioseguridad son pobres, con escasez de recursos humanos y recursos financieros.

En comparación al cultivo LJ comercial, el ensayo MODS obtuvo una sensibilidad del 100%. Se obtuvo una sensibilidad del 96% en MODS al realizar la comparación con la baciloscopia. Estudios realizados anteriormente reportan que el cultivo LJ presenta una sensibilidad del 84%. ⁽⁹⁾

La sensibilidad de la baciloscopia varía de acuerdo a la calidad de la muestra; en un estudio informan que la sensibilidad de la baciloscopia está entre el 50 - 80%. ⁽⁹⁹⁾ Con los resultados obtenidos podemos indicar que el ensayo MODS presenta una mayor sensibilidad ante el cultivo LJ y la baciloscopia.

De las 150 muestras recolectadas, se obtuvieron 5 muestras que resultaron positivas en MODS y en el cultivo LJ, pero negativas en baciloscopia, esto demuestra que la sensibilidad de la baciloscopia para la detección de todos los casos es baja. ⁽¹³⁾

Por sus características, el cultivo tiene ventajas que lo ubican como el "patrón de oro" en el diagnóstico y seguimiento de los casos de TB, al permitir el aislamiento, la identificación del germen y las pruebas de sensibilidad posteriores

El cultivo es más sensible en el diagnóstico y, en general, se diagnostican con él hasta 40% más muestras positivas. Sin embargo, la desventaja es que el diagnóstico por cultivo tarda 3 a 6 semanas antes de dar un resultado positivo. Además, como ya se mencionó anteriormente en países en desarrollo, muchos laboratorios no son aptos para el cultivo de micobacterias por falta de bio-seguridad, personal entrenado y carencia del medio de cultivo específico que se requiere para su aislamiento.⁽¹⁰⁰⁾

En este estudio el ensayo MODS obtuvo una especificidad del 100% al comparar con la prueba de referencia (cultivo LJ). Y se obtuvo un 93% de especificidad en MODS al realizar la comparación con la baciloscopia. Otros estudios informan que el cultivo LJ presenta una especificidad del 98,7%.⁽¹⁰¹⁾ Con esto podemos constatar que el ensayo MODS presenta una mayor especificidad que el cultivo LJ. La especificidad de la baciloscopia es del 95%,⁽¹²⁾ el ensayo MODS presentó una especificidad relativamente baja ante la baciloscopia.

Los resultados obtenidos son similares a resultados obtenidos en anteriores investigaciones. Ya que en varios estudios informaron que la sensibilidad del ensayo MODS supera a la sensibilidad del cultivo LJ.^(13; 14; 15; 102) Reportando una sensibilidad del 78%, 92%, 93% y 76% en la tinción con Auramina, MODS, MGIT (Micobacteria growth indicator tube) y cultivo LJ, respectivamente. Como podemos notar el ensayo MODS no solo fue comparado con el cultivo y la baciloscopia, sino también con otras técnicas de diagnóstico, en este caso el MGIT. El ensayo MODS presentó una sensibilidad ligeramente

menor que la del MGIT, pero MODS detecto al M. tuberculosis en un tiempo medio de 9 días, siendo más rápido que el MGIT para obtener resultados positivos. ⁽¹⁴⁾ Otro estudio sustenta que el ensayo MODS es más rápido (tiempo promedio 8 días) aunque ligeramente menos sensible que MGIT (tiempo promedio 11 días). ⁽¹⁰³⁾

La sensibilidad y la especificidad de un test presentan una relación inversa, es decir, a mayor sensibilidad menor especificidad y viceversa. Un test diagnóstico ejecutado correctamente tiene una sensibilidad y especificidad sin cambios. Tanto la sensibilidad como la especificidad se mantienen constantes aunque la prevalencia de la enfermedad varíe.

De las 150 muestras, 3 (4%) de las muestras presentaron baciloscopia positiva pero dieron negativo en MODS. Estas 3 muestras también dieron negativo en el cultivo LJ comercial y en el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis.

Teóricamente, el porcentaje de muestras positivas por baciloscopia, pero negativo por el cultivo debe ser inferior al 1%, y estas muestras con baciloscopia positiva, con cultivo negativo se observa en pacientes que ya están con terapia antimicrobiana instaurada.

(104)

Errores de laboratorio, como ser, la decontaminación prolongada, acortamiento en los tiempos de incubación del cultivo, contaminación cruzada de los frotis, puede resultar en muestras con baciloscopia positiva, pero con cultivo negativo. ⁽¹⁰⁴⁾

Otra de las causas por la cual se podría presentar esta situación de muestras con baciloscopia positiva y cultivo negativo, serian la mala conservación de la muestra, o el tiempo prolongado de almacenamiento de la muestra, desde la obtención de la muestra

hasta la fecha de siembra. Una de las muestras que se encuentra en esta situación , es una de las primeras muestras enviadas desde Caranavi. Las primeras muestras enviadas de Caranavi no se encontraban a temperatura apropiada durante su trayectoria hasta llegar el Instituto SELADIS. Por lo cual se considera que la población bacilar pudo disminuir durante la trayectoria, considerando que la muestra tampoco presentaba una elevada carga bacilar, según los resultados de baciloscopia.

Otra de las muestras con esta situación, también presentaba una baja carga bacilar, y era la única muestra positiva de las tres muestras recolectadas por el paciente . Por lo cual se podría inferir una contaminación cruzada en la baciloscopia. Ya que para reducir al mínimo la contaminación cruzada en el ensayo MODS, las placas se sellaron permanentemente con tapas de silicona, además estas placas fueron colocadas dentro de bolsas de plástico ziplock después de la inoculación de las muestras, además en el ensayo MODS, en los pocillos de control libres de muestra que contienen sólo caldo, no se observó crecimiento, lo cual indica que cuando se aplicó el MODS en esta muestra no hubo contaminación cruzada.

La sobrecarga de trabajo, la alta frecuencia de muestras con baciloscopia positiva en la rutina, el desorden, los procedimientos poco rigurosos, la utilización de reactivos no alicuotados, entre otros, representan condiciones propicias para este tipo de contaminación en el laboratorio. Existiendo el riesgo de transferir material infectado por salpicaduras, de las manos a la ropa, mediante soluciones, pipetas o dispensadores contaminados.⁽¹⁰⁾

Causas por las cuales se obtienen falsos positivos en la baciloscopia: decoloración insuficiente, precipitación de cristales por uso de reactivos no filtrados o calentamiento excesivo, uso de microscopio en mal estado, poco entrenamiento para diferenciar bacilos de artificios de coloración, transferencia de bacilos de un extendido a otro por el asa mal

flameada (lo cual no pudo ocurrir en este estudio ya que al hacer las baciloscopias no utilizan azas, solo pequeños trozos de madera que son desechados después de su uso), salpicaduras o el dispensador de aceite de inmersión contaminado, confusión de muestras y/o extendidos, errores en transcripción de resultados y que se detectan BAAR que pueden ser no patógenos y/o microorganismos del género nocardia cuya morfología es bastante similar a la de los bacilos tuberculosos.⁽¹⁷⁾

La contaminación cruzada puede originar resultados falsos positivos del cultivo.⁽¹⁰⁾ En el caso del ensayo MODS se obtuvo una muestra como falso positivo, esta muestra presentaba una baciloscopia positiva pero en el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis resulto negativa hasta el día 60, en este caso el cultivo que resulto negativo fue en el medio Ogawa. La gran desventaja de este medio de cultivo es la poca cantidad de muestra que se utiliza, ya que para sembrar en el medio Ogawa se utiliza el método de decontaminación de Kudoh, en el cual se siembra directamente la muestra tomada con un hisopo y en contacto con el NaOH 4%,⁽¹¹⁾ a diferencia del método de decontaminación que se utiliza en MODS, en el cual se utiliza un volumen de muestra mayor (2ml).

En este estudio se obtuvo una tasa de contaminación del 3% con el ensayo MODS y 23% con el LJ comercial, en el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis se obtuvo una tasa de contaminación del 2%. Esta tasa de contaminación menor del 2% sugiere una decontaminación muy severa, las tasas de contaminación mayores de 5-8% se deben a una insuficiente decontaminación.⁽¹⁰⁵⁾ El bacilo de la tuberculosis es más resistente, pero una proporción no despreciable de BAAR muere durante el procedimiento, entre 30 y 60 % dependiendo del método. El efecto letal es

mayor cuanto mayor es la concentración de la base y cuanto más prolongado es el tratamiento. De manera que es necesario controlar el tiempo de contacto con ella para preservar la viabilidad del bacilo de la tuberculosis, tanto como sea posible. ⁽¹⁰⁾ Es por ello que en este estudio se tuvo mucho cuidado con el tiempo de contacto entre la muestra y la solución digestiva, por lo cual en el ensayo MODS no se obtuvo un porcentaje de contaminación menor al 2%.

El cultivo LJ comercial, obtuvo una tasa de contaminación que superó el 8%. Todos los cultivos contaminados no fueron incluidos para determinar los resultados de este estudio. De los 35 cultivos que fueron reportados como contaminados, se observó que algunos medios fueron degradados y otros medios adquirieron un color verde oscuro (ANEXO 14). Ciertos microorganismos contaminantes proteolíticos degradan el medio de cultivo. Otros producen ácido a partir de los constituyentes del medio, bajan el pH y degradan el verde de malaquita del medio que adquiere un color verde oscuro. El bacilo de la tuberculosis no crece en medio degradado ni acidificado. ⁽¹¹⁾

Un cultivo contaminado tardíamente puede enmascarar el desarrollo de *M. tuberculosis*, por lo que antes de descartar el cultivo es conveniente hacer un frotis con material del medio y colorear por Ziehl Neelsen, ⁽¹¹⁾ por lo cual en varios de los cultivos LJ comercial, que presentaron una contaminación tardía, es decir que se observó contaminación entre el día 20 y 40, se les realizó tinción Ziehl Neelsen, en algunos cultivos la tinción dio positivo, por lo cual los cultivos fueron reportados como positivos y fueron incluidos en el análisis estadístico, en el caso de los cultivos que resultaron negativos en la tinción Ziehl Neelsen, fueron reportados como contaminados, y fueron excluidos del análisis estadístico.

Se utilizó el mismo procedimiento de descontaminación para MODS y LJ comercial, la única diferencia fue que una de las grandes ventajas del ensayo MODS es que utiliza un reactivo adicional que se agrega al cultivo líquido denominado PANTA (ver procedimiento y anexo 10), la adición de este reactivo fue uno de los factores por el cual se obtuvo menos porcentaje de contaminación en MODS ya que el PANTA es una mezcla de antibióticos (Ácido Nalidixico, Anfotericina, Polimixina B, Azlocilina y Trimetopria) que evita el crecimiento de flora comensal diferente al bacilo minimizando así el riesgo de contaminación.⁽⁹⁵⁾

Otra de las posibles causas por las cuales se pudo evidenciar una alta tasa de contaminación en el LJ comercial, fue el almacenamiento de la muestra, ya que algunas muestras fueron almacenadas más de 2 días, desde la recolección de la muestra; esto ocurrió en una parte de las muestras procedentes de Caranavi, no se pudo evitar procesar muestras guardadas más de 2 días, esto debido a la dificultad del envío de las muestras desde el municipio de Caranavi hasta la ciudad de La Paz. Por otra parte también se pudo procesar muestras, almacenadas por más de 2 días, procedentes de los otros centros de salud, ya que no podemos asegurar que el paciente haya obtenido la muestra el mismo día que se procesó esta muestra por baciloscopia. El almacenamiento prolongado puede ser causa de la contaminación, por ejemplo en el caso de que la muestra sea salival y es almacenada mucho tiempo existe mayor posibilidad de que esta muestra se contamine en el cultivo, ya que al ser una muestra salival, contiene mayor cantidad de flora microbiana que se encuentra normalmente en la boca.

El mal almacenamiento de la muestra puede ser otro factor por el cual se presentó este porcentaje de contaminación, ya que las muestras deben ser preservadas de la luz solar,

deseccación y calor, para lograr el aislamiento de *M. tuberculosis* a través del cultivo. ⁽¹¹⁾ Desde la obtención de la muestra hasta la recolección de la misma, existe la posibilidad de que la muestra haya estado en las condiciones ya mencionadas.

Otra factor al cual se atribuye la elevada tasa de contaminación presente en el LJ comercial, podría ser la técnica de decontaminación que se utiliza para MODS (N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio (NALC-NaOH)), ya que se realizó la prueba con la técnica de Petroff no modificada para inocular en los LJ comerciales, y se obtuvieron resultados libres de contaminación, pero solo se realizó esta prueba con una pequeña cantidad de muestras. Un porcentaje reducido de muestras se contaminaron en MODS y en el cultivo LJ comercial; en el caso de MODS se pudo distinguir el desarrollo del *M. tuberculosis*, a pesar de la contaminación, por lo cual fue reportado como positivo, pero en el caso del LJ comercial estas muestras se contaminaron y no se pudo distinguir ningún desarrollo de *M. tuberculosis*, por lo cual solo se reportaron como contaminados.

Además del alto porcentaje de contaminación del LJ comercial, se pudo observar desarrollo disgónico en la mayoría de las muestras inoculadas. Por lo cual se fue al INLASA a medir el pH de este medio, ya que en el catálogo no indicaba el pH en el cual se encontraba. Se obtuvo un pH de 7,24. El bacilo de la tuberculosis sobrevive y se multiplica a un pH cercano al neutro. Para neutralizar la muestra decontaminada con hidróxido de sodio se puede agregar una solución ácida gota a gota hasta que vire un indicador de pH. Este proceso debe ser controlado muy rigurosamente. Cualquier defecto o exceso de la solución ácida origina un pH ácido no apto para el desarrollo del bacilo. Para evitar este riesgo se prefiere en las normas actuales aplicar procesos de lavado con un buffer de pH neutro para eliminar la base utilizada para decontaminar. ⁽¹⁰⁾ En nuestro caso solo

agregamos de 1 a 2 gotas de HCl 1M, en algunas muestras que no viraban de color se les agrego hasta 4 gotas de HCl, se controló el desarrollo de estas muestras y no se obtuvieron resultados erróneos.

Basados en las características de crecimiento tanto en caldo y en el medio sólido y resultados del test de niacina, todos los aislados en MODS y cultivo en medio sólido, fueron clasificados como *M. tuberculosis*. Por lo cual podemos indicar que MODS es capaz de aislar solo *M. tuberculosis*.

En MODS no se puede observar el desarrollo de *M. bovis*, ya que el caldo Middlebrook contiene glicerol como fuente de carbono y *M. bovis* raramente crece a partir de una muestra clínica en un medio con glicerol porque no puede procesar este compuesto o lo hace con mucha dificultad, prefiere un medio con piruvato o glutamato de sodio. ⁽¹⁰⁾

Entre las muestras recolectadas se obtuvieron tres muestras que presentaban bacilos fragmentados en la baciloscopia, en el registro del paciente no estaba indicado que el mismo este recibiendo tratamiento, por lo cual se incluyó estas muestras en el estudio, en estas muestras se obtuvieron resultados positivos por MODS, ya que en el medio de cultivo utilizado en esta técnica, contiene biotina y catalasa, ambos compuestos estimulan el desarrollo de bacilos dañados. ⁽¹⁰⁾

Es posible distinguir las colonias características de *M. tuberculosis* desarrolladas en un medio sólido a base de huevo. Cuando se detecta desarrollo en un medio líquido es necesario verificar mediante una baciloscopia si se trata de BAAR, porque visualmente es muy difícil distinguir el desarrollo del bacilo de la contaminación; ⁽¹⁰⁾ Otra de las grandes ventajas del ensayo MODS es que no es necesaria una baciloscopia para verificar si se trata de BAAR, ya que el desarrollo de la *M. tuberculosis* es característico y fácil de reconocer,

porque que consiste en cordones característicos del microorganismo (ANEXO12),⁽¹³⁾ que a medida que van pasando los días estos cordones van adquiriendo formas de letras chinas, particularidad que no expresan las micobacterias atípicas.

El medio con agar transparente facilita la visualización de colonias pequeñas y puede ser inspeccionado con una lupa o microscopio, lo que adelanta la detección de los cultivos positivos. En el caso del ensayo MODS se puede adelantar la detección con la ayuda del microscopio de luz invertida, con la gran ventaja de que cuando el M. tuberculosis desarrolla no genera turbidez en el caldo.

La mayor parte de las muestras con baciloscopia 3 cruces evidencian desarrollo dentro de las primeras 3 semanas de incubación en medios a base de huevo, y dentro de los 10 días en medios más enriquecidos.⁽¹⁰⁾ En este estudio en todas las muestras que presentaban una baciloscopia de 3 cruces (23 muestras), el ensayo MODS mostró resultados a los días 5 o 6. A partir de muestras con muy escasos bacilos, no detectables por baciloscopia, las colonias aparecen tardíamente, aproximadamente hasta 8 semanas después de la siembra en medios a base de huevo y hasta 6 semanas de ser sembradas en agar o caldos enriquecidos.⁽¹⁰⁾ Sin embargo en nuestro estudio en el caso de muestras con baciloscopia con número de BAAR, se obtuvieron por MODS resultados positivos en un máximo de 11 días, con un mínimo de 6 días.

Al inicio de este estudio se procesó más de una muestra por paciente, esto solo en el caso de que, entre las tres muestras del paciente existieran muestras con baciloscopia positiva y otras con baciloscopia negativa. Esto se realizó con el propósito de observar la sensibilidad de MODS, obteniendo resultados favorables, ya que en las muestras con

baciloscopia negativa se logró observar desarrollo. Por razones técnicas se comenzó a procesar solo una muestra por paciente.

Al determinar el tiempo de diagnóstico de *M. tuberculosis*, mediante MODS, cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis y cultivo LJ comercial, podemos notar claramente una gran diferencia entre los días de desarrollo de *M. tuberculosis*, obteniendo los resultados de forma más rápida mediante MODS con un promedio de 6 días, seguido por el cultivo LJ comercial y por último el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis con un promedio de 34 días.

El cultivo LJ comercial reveló un desarrollo de las colonias en un promedio de 23 días, este promedio se debe a que las lecturas de estos cultivos se iniciaron al día 15, a diferencia de los días de lectura de los cultivos realizados en los centros de referencia, debido a que no cuentan con el tiempo requerido para revisar con mayor frecuencia estos cultivos, esto debido a la cantidad elevada de pacientes que solicitan el estudio, por lo cual las lecturas se inician al día 20.

Otra de las causas por las cuales el cultivo LJ comercial presentó un promedio menor que el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis, es que en el LJ comercial se reportó como positivo el día en el que se observó el mínimo desarrollo de colonias, pero se esperó hasta el día 40 o 60 para realizar el test de niacina y de esta manera confirmar los resultados.

Al realizar una relación entre el grado de positividad de la baciloscopia y el día de desarrollo en MODS, cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis y LJ comercial. En el ensayo MODS se puede notar que en las muestras que

presentan una baciloscopia de 3 cruces, ya se puede observar desarrollo de *M. tuberculosis* al día 5 o 6, incluso en algunas muestras se pudo observar desarrollo al día 4, esto no fue reportado ya que en la técnica de MODS indica que las lecturas se deben iniciar al día 5 después de la siembra⁽⁹⁵⁾, pero en este estudio podemos indicar que incluso antes del día 5 se pueden obtener resultados positivos, en el caso de que la carga bacilar de la muestra sea elevada.

También podemos notar que alguna de las muestras que presentan una baciloscopia de 2 cruces o 1 cruz, puede reportarse como positivo al día 5, con un máximo de 11 días. En el caso de las muestras con baciloscopia de 1 - 9 BAAR, se logró obtener resultados en un mínimo de 6 días, con un máximo de 16 días.

Podemos indicar que a pesar de que la muestra presente una baja carga bacilar, se puede obtener resultados en un tiempo menor que en el cultivo en medio sólido.

Los sistemas líquidos, como el BACTEC MGIT-, permiten una rápida detección del crecimiento de las micobacterias (de 1 a 3 semanas), en comparación con los medios sólidos, donde el crecimiento se lleva de 3 a 8 semanas, pero proporcionan una oportunidad para examinar la morfología de la colonia y detectar cultivos mixtos.⁽⁶³⁾ Sin embargo, además, el ensayo MODS permite la detección de contaminantes y el examen de colonias bajo el microscopio.⁽¹⁵⁾

En otros estudios se obtuvieron resultados similares, se reportó que en el MODS, el cultivo micobacteriano automatizado y el cultivo en medio Lowenstein -Jensen el tiempo promedio transcurrido hasta la positividad de los cultivos fue de 7, 13 y 26 días, respectivamente.⁽¹³⁾

Si un cultivo MODS es negativo al día 15, hay una posibilidad de 99,7% que la muestra sea verdaderamente negativa. Por lo tanto, creemos que un cultivo MODS negativo puede ser desechado después de 3 semanas.⁽¹³⁾ En este estudio MODS obtuvo el 50% de los resultados positivos al día 5, solo una muestra (con baciloscopia 5BAAR) dio positivo al día 16, siendo el tiempo máximo de diagnóstico en MODS. Por lo cual se confirma que un cultivo MODS negativo puede ser desechado después de 3 semanas.

Al realizar la relación del día de desarrollo de M. tuberculosis según el grado de positividad de la baciloscopia, en el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis se pudo notar que la mitad de las muestras con baciloscopia 3 cruces dieron positivo en el cultivo al día 20. Pero también existieron pocas muestras que presentaban una baciloscopia de 3 cruces y que se reportaron como positivos en cultivo al día 60.

El grado de positividad de la baciloscopia está relacionado con el grado de positividad en el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis, ya que al procesar una muestra con baciloscopia 3 cruces el cultivo es óptimo, pero siempre y cuando exista una buena conservación de la muestra (en refrigeración)⁽¹¹⁾

En el caso del cultivo LJ comercial, las muestras con baciloscopia de 3 cruces, resultaron positivas en el cultivo entre el día 15, 20 y algunas en el día 40. En el cultivo LJ comercial no se obtuvo un desarrollo óptimo, a comparación con el cultivo estandarizado por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis, pero si se pudo observar un desarrollo escaso a los días ya indicados.

El costo de 2 dólares por muestra para el ensayo MODS se compara favorablemente con el costo de 6 dólares por muestra de Lowenstein-Jensen y el método de las proporciones, sin embargo, los costos del personal técnico calificado pueden ser más alto para el cultivo de MODS.⁽¹³⁾ El costo es un factor importante para cualquier intervención de salud, sobre todo en los entornos con recursos limitados. Se ha indicado que el costo de MODS es más bajo que los de otros métodos.⁽⁸⁰⁾

Las ventajas potenciales de MODS incluyen rapidez (en comparación con los métodos de cultivo en medio sólido) y el potencial de bajo costo (en comparación con el cultivo estandarizado). La preparación de la muestra para MODS es similar a la requerida para la preparación de una muestra de esputo para cultivo. La detección microscópica de las micobacterias en MODS es técnicamente similar al examen microscópico de un frotis. Estas son las características que hacen al ensayo MODS adecuado para su uso en entornos de escasos recursos.⁽¹⁰⁶⁾ Incluso en MODS se puede realizar la lectura con precisión de un pozo por minuto, considerablemente más rápido que el tiempo que se tarda en leer una baciloscopia.

Además MODS tiene la ventaja del back up, que es utilizado en el caso de contaminación en los pozos de la placa MODS, de tal manera que se pueda volver a sembrar siempre y cuando no se haya contaminado la muestra en el proceso de decontaminación.

En los países con alta prevalencia de tuberculosis, la alta sensibilidad y especificidad de MODS y la disponibilidad rápida de los resultados, pueden ayudar a aumentar la proporción de pacientes confirmados microbiológicamente y con ello reducir el número de casos tratados empíricamente^(13; 107).

12. CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio demostraron que el ensayo MODS supera a los métodos microbiológicos convencionales utilizados en nuestro país; ya que este fue capaz de detectar al *M. tuberculosis* en muestras de esputo con una alta sensibilidad, especificidad y sobre todo mayor rapidez con una inversión económica y tecnológica reducida

Los resultados obtenidos mediante el ensayo MODS muestran que: el ensayo MODS presenta una concordancia casi perfecta con las técnicas microbiológicas convencionales para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, es decir la baciloscopia y el cultivo en medio sólido, utilizados para el diagnóstico de rutina en nuestro país.

Al determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del ensayo MODS ante la baciloscopia, se obtuvieron resultados favorables para MODS, ya que este presentó una elevada sensibilidad y especificidad.

De igual manera al determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del ensayo MODS con el cultivo LJ comercial, se obtuvo una elevada sensibilidad y especificidad en MODS.

Si bien la sensibilidad y especificidad del ensayo MODS y el cultivo LJ estandarizado por los laboratorios de referencia de TB son equivalentes, los resultados obtenidos por el método propuesto son mucho más rápidos si comparamos la variable tiempo.

Finalmente con los resultados obtenidos, se puede indicar que el ensayo MODS puede ser considerado como un buen método alternativo para el diagnóstico de rutina de TB pulmonar, ya es un método más rápido, sensible y específico; y comparando con el cultivo en medio sólido utilizado en nuestro medio, es menos costoso y factible para ser

aplicado en países en vías de desarrollo, por lo tanto ideal para ser aplicado en nuestro país.

De esta manera confirmamos la hipótesis planteada.

Bibliografía

1. Montes NH. Tuberculosis. Rev Paceaña Med Fam 2008; 5(7): 38-42.
2. Cadena F, Alonso M, Alarcón N, Guajardo V, Botello Y. Relación de los factores biológicos, socioculturales y apoyo social con la responsabilidad en salud a pacientes con Tuberculosis pulmonar: Revista Enfermería Universitaria ENEO-UNAM. . 2007 abril 1; 4: 15.
3. Tuberculosis. Gobierno Autonomo Departamental Santa Cruz. Disponible en: <http://www.santacruz.gob.bo/equitativa/salud/programas/contenido.php?IdNoticia=465&IdMenu=130#ancla> Acceso 17 de noviembre de 2012. .
4. World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO, Geneva, 2006:1-242. .
5. Informe mundial sobre la tuberculosis 2012. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr12_executivesummary_es..pdf Acceso 17 de noviembre del 2012.
6. Programa Nacional de Control de la Tuberculosis Disponible en: http://vigisalud.mspbs.gov.py/index.php?option=com_content&view=article&id=11&catid=23&Itemid=101 Acceso 26 de junio del 2013.
7. Parimango D., Chávez M., Luján M., Otiniano M., Robles H. y Muñoz E. Comparación de los medios Ogawa y Löwenstein-Jensen en el aislamiento de Mycobacterium tuberculosis de pacientes con tuberculosis pulmonar. Hospital Regional Docente de Trujillo, Perú. 2007. págs. 24-31.
8. Llaca J. M., Flores A., Martínez M. G. y Cantú P. C. La Baciloscopia y el cultivo en el diagnóstico de la Tuberculosis Extrapulmonar. Departamento de Patología Clínica, Hospital Universitario "Dr. José E. González", Universidad Autónoma de Nuevo León.
9. Moore D., Mendoza D., Gilman R., et al. 2004 Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay, a Rapid, Reliable Diagnostic Test for Multidrug-Resistant Tuberculosis Suitable for Use in Resource-Poor Settings. J. Clin. Microbio.; 42:10.4432-4437. Moore D., Evans C, Gilman R., Caviedes L., Coronel J., Vivar A., et al. 2006, Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for the Diagnosis of TB. n engl j med , pág. 355;15.
10. Barrera L., Malbran CG. Manual para el Diagnóstico de la Tuberculosis. 2da parte. Cultivo. Organizacion Panamericana de la salud. 2008.
11. Camacho M., Magne M., Mollinedo JC., Calderon L. Manual de procesamientos técnicos para Cultivo de micobacterias de la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis. La Paz-Bolivia: 2011. PrintArtesGráficas. N° 230 .

12. Caminero Luna JA. Métodos no convencionales y nuevas técnicas en diagnóstico de tuberculosis . En: Guía de la Tuberculosis para especialistas. Cap 8. PARIS. Unión Internacional Contra Tuberculosis y Enfermedades respiratorias 2003. p 127-155).
13. Moore D., Evans C, Gilman R., Caviades L., Coronel J., Vivar A., et al. Microscopic - Observation Drug-Susceptibility Assay for the Diagnosis of TB. *n engl j med* 355;15 october 12, 2006.
14. Caviades L, Lee T, Gilman R, Sheen P, Montenegro S. Rapid, Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis in Sputum by Microscopic Observation in Broth Cultures. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1203-1208.
15. . Shiferaw G, Woldeamanuel Y, Gebeyehu M, et al. Evaluation of microscopic observation drug susceptibility assay for detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *J ClinMicrobiol.* 2007;45(4):1093-1097.
16. Arias M, Mello FC, Pavon A, et al. Clinical evaluation of the microscopic-observation drug-susceptibility assay for detection of tuberculosis.*Clin Infect Dis.* 2007;44:674-680. .
17. Sequeira MD., Barrera L. Manual para el Diagnóstico. Parte I Baciloscopia. Organización Panamericana de la salud. 2008.
18. Callisaya J, Catacora V. Validación del método de concentración con hipoclorito de sodio para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. 2008 BIOFARBO v.16 ISSN 1813-5363 .
19. Kim T C, Blackman R S, Heatwole K M, Kim T, Rochester D F. Acid -fast bacilli in sputum smears of patients with pulmonary tuberculosis. Prevalence and significance of negative smears pretreatment and positive smears post-treatment. *Am Rev Respir Dis* 1984;
20. Levy H, Feldman C, Sacho H, van der Meulen H, Kallenbach J, Koornhof H. A reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest* 1989; 95: 1193-7.
21. Jiménez E. Herramientas para prevenir, diagnosticar y tratar la TB. Panama. julio 2011.
22. Wilson ML. Recent advances in the laboratory detection of Mycobacterium tuberculosis complex and drug resistance. *Clin. Infect. Dis.* 2011 jun;52(11):1350 -5.
23. Elinav H, Kalter HD, Caviades L, Moulton LH, Lemma E, Rajs A, Block C, Maayan S. Training Laboratory Technicians from the Ethiopian Periphery in the MODS Technique Enables Rapid and Low-Cost Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Am J Trop Med* .

24. Granado M., Jimenez A. Manual de Normas Técnicas en Tuberculosis. Edición Gestión 2005. La Paz - Bolivia.
25. Enfermedades infecto-contagiosas.Registro N° 188.540.Disponible en: <http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/EnfermInfectocontagiosas.htm>. Acceso 14 abril 2013. .
26. Medina J.F., Calero C., Álvarez F.J. y Romero A. Tuberculosis Pulmonar. Medicine. 2010;10(67):4587-96.
27. Smith I. Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence.Clin Microbiol Rev. 2003 July; 16(3): 463-496.
28. Rothschild B, Martin L, Lev G, Bercovier H, Bar-Gal G, Greenblatt C, Donoghue H, Spigelman M, Brittain D. Mycobacterium tuberculosis complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. pgs. 305-11, s.l. : Clin Infect Dis, 2001, Vol. 33.
29. Báguena Cervellera, María José. La Tuberculosis y su historia. Fundación Uriach. ISBN 84-87452-12-4. .
30. Koch R.1884. Die Aetiologie der Tuberkulose. Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte; 2: 1-88.
31. Collins CH, Grange JM, Yates MD. Identification of species and variants of tubercle bacilli. En: Organization and practice in tuberculosis bacteriology. Londres, Boston: Butterworths and Co Ltd, 1985; 59-66.
32. Características morfológicas y estructurales de Mycobacterium tuberculosis. Disponible en: http://demostraciondelbacilodekoch.blogspot.com/2011/06/caracteristicas-morfologicas-y_03.html. Acceso el 26 de marzo 2013.
33. Morua K. Mycobacterium tuberculosis. 25 de abril 2012 Disponible en <http://equipo5kafamolu.blogspot.com/> Acceso el 17 de abril de 2013. .
34. Mycobacterium. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Mycobacterium&oldid=64578976>. Acceso el 26 de marzo 2013. .
35. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología Medica.5 ed. Madrid: ELSEVIER MOSBY; 2006.
36. Ryan KJ, Ray CG (editors) (2004). Sherris Medical Microbiology (4th ed. edición). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.
37. Disponible en <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000077.htm> Acceso el 26 de marzo 2013.

38. Pantoja M, Golberger R. Tuberculosis infantil, una enfermedad prevalente en Bolivia. *Rev. Soc. Bol. Ped.* 2002; 41 (3): 118 - 119 .
39. Arnedillo A. Tuberculosis Pulmonar. Disponible en: http://www.arnedillo.info/doc/tuberculosis_pulmonar.pdf Acceso el 26 de marzo 2013.
40. Horsburgh CR Jr. Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States. *N Engl J Med.* 2004;350:2060-7.
41. American Thoracic Society. Diagnostic standards and clasification of tuberculosis. Tuberculin Skin Test. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 723-735.
42. Bass JB, Farer LS, Hopewell PC, Jacobs RF, Snider DE. Diagnostic standars and classification of tuberculosis. *Am Rev Resp Dis* 1990; 142: 725-745.
43. Rossman MD, Oner-Eyuboglu AF. Clinical presentation and treatment of Tuberculosis. In Fishman AP. *Pulmonary Diseases and Disorders.* New York: McGraw-Hill 1998; pp:2483-2502.
44. Tuberculosis pulmonar. Disponible en: <http://web.udl.es/usuaris/w4137451/copia%20webresp/teoria/t13/tema.htm> acceso el 26 de marzo 2013.
45. GUÍAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO, Servicio de Neumología. Disponible en: http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/neumo/guias10/dos.pdf Acceso el 3 de junio 2013.
46. Herchline Thomas. Tuberculosis. *Infectious Diseases - Mycobacte-rial Infections* Oct 4, 2010 <http://www.imedicine.com/DisplayTopic.asp?bookid=6&topic=2324> . Consultada el 24 Oct 2010.
47. Jacob Jesse T, Mehta Aneesh K, LeonardMichael K. Acute Forms of Tuberculosis in Adults. *The American Journal of Med-icine* 2009 January; 122(1): 12-17.
48. Juárez M, Zaragoza K, Criales J. Tuberculosis pulmonar. *Anales de Radiología México* 2009;4:319-329.
49. Jeong Y. Pulmonary Tuberculosis: Up-to-Date Imaging and Management *AJR* 2008; 191: 834-44.
50. World Health Organization (2010) *Global Tuberculosis Control: A Short Update to the 2009 Report.* Geneva, Switzerland: WHO.
51. Organización Panamericana de la Salud. *Las condiciones de salud en las Américas* 2002. Washington: OPS; 2005.

52. Tuberculosis pulmonar. Disponible en: http://www.hospitalgeneral.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/neumo/1tuberculosis_pulmonar.pdf Acceso el 21 de abril 2013.
53. Schluger NW. Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial. Infections in Older Adults. Clin Chest Med 2007;28: 773-81.
54. Castellanos MJ, García MA, Téllez HA. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Nú.m 13. Vol. 25. Semana 13 del 23 al 29 de marzo de 2008. Secretaría de Salud.
55. El tratamiento y el control de la tuberculosis salva 20 millones de vidas. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/tb_20121017/es/index.html Acceso el 21 de abril 2013.
56. Jeong Y. Pulmonary Tuberculosis: Upto-Date Imaging and Management AJR 2008; 191: 834-44.
57. Berlin L. Tuberculosis: Resurgent Disease. AJR 2008; 190: 1438-44.
58. Rodríguez Tamayo R, Vega Almeida R. Tuberculosis: un problema de salud en expansión. RTVTuberculosis.2002; 7(2): 1028-4338.
59. Rodríguez J.E., Chinea G., Zamora S. Algunos factores epidemiológicos de la tuberculosis en el municipio de Morón. MEDICIEGO 2013; 19 (1).
60. Tuberculosis en Bolivia: Hay 8 mil nuevos casos por año. Disponible en: <http://www.eabolivia.com/salud/6761-tuberculosis-en-bolivia-hay-8-mil-nuevos-casos-por-ano.html> Acceso 21 de abril 2013.
61. Torraldes J., Rumí L. y Albert C. Prueba de Matoux. Disponible en: <http://www.eccpn.aibarra.org/temario/seccion2/capitulo36/capitulo36.htm> Acceso 27 de abril 2013.
62. Alcaide F., Moreno J., González J. y Palacios J. Procedimientos en Microbiología Clínica. España. SEIMC. 2005 .
63. American Thoracic Society. 2000. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 161:1376-1395.
64. Miret P, Pina JM, Juncosa S. Tuberculin reactivity in bacillus Calmette -Guérin vaccinated subjects. Tuber Lung Dis. 1996;77:52-8.
65. Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion and reversion. Am J Respir Crit Care Med. 1999;159:15-21.

66. Ruiz J., Blanquer R., Calpe J.L., Caminero J.A., Caylá J., Domínguez J.A., et al. Diagnostico y tratamiento de la tuberculosis Arch Bronconeumol. 2008;44(10):551 -66.
67. Lalvani A, Nagvenkar P, Udwardia Z, Pathan AA, Wilkinson KA, Shastri JS, et al. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent Mycobacterium tuberculosis infection in healthy urban Indians. J Infect Dis. 2001;. 183: 469-77.
68. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet. 2000;356:1099-104.
69. Domínguez J, Ruiz-Manzano J. Prueba de la tuberculina: ¿es la hora del cambio? Arch Bronconeumol. 2006;42:47-8.
70. Domínguez J, Ruiz-Manzano J, De Souza-Galvão M, Latorre I, Milà C, Blanco S, et al. Comparison of two commercially available interferon-gamma blood tests for immunodiagnosis of tuberculosis infection. Clin Vaccine Immunol. 2008;15:168-71.
71. Caminero Luna JA. Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. International union against tuberculosis and lung disease. Paris: Imprimerie Chirat; 2003.
72. Palomino JC, Cardoso Leão S, Ritacco V. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. Disponible en: <http://www.tuberculosis2007.com/tuberculosis2007.pdf>.
73. Mase S, Neg V, Henry MC et al. Yield of serial sputum smear examination in the evaluation of pulmonary tuberculosis: a systematic review. Geneva, Switzerland: Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR), World Health Organization. s.l. : , And Foundation for innovative New Diagnostics, (FIND) 20053.
74. Organización Panamericana de la Salud. 1988. Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para la Bacteriología de la Tuberculosis Parte I La Muestra. El Examen Microscópico. OPS Nota Técnica Núm. 26/Rev. I. .
75. Dorronsoro I, Torroba L. Microbiología de la Tuberculosis. Arch Bronconeumol. 2008;44(10):551-66.
76. Hopewell P, Pai M, Dermot M, Uplekar M, Raviglione MC. International Standard for tuberculosis care. Lancet Infect Disc 2006; 6:710.
77. Fraser RS, Muller NL, Colman N, Pare PD. Diagnostico de las Enfermedades del Torax. Micobacteriosis. Cap 27. Cuarta ed. BUENOS AIRES. Editorial M'edica Panamericana. 2002. 837-838.
78. Iseman MD et al. Rapid detection of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. N Eng J Med 2006; 355: 1606 - 8.

79. Moore DA. Future prospects for the MODS assay in multidrug-resistance tuberculosis diagnosis. *Future Microbiol* 2007; 2(2), 97-101.
80. Caviades L, Moore DA. Introducing mods: A low-cost, low-tech tool for highperformance detection of tuberculosis and multidrug resistant tuberculosis. *Indian J Med Microbiol* 2007; 25: 87-8.
81. Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID). Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Área de Mycobacterium. Guía de MODS. Lima -Perú. v 12.1 14082008.
82. Observación microscópica de susceptibilidad de medicamentos, disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Observaci%C3%B3n_microsc%C3%B3pica_de_susceptibilidad_de_medicamentos Acceso 23 de Noviembre de 2012 . .
83. Caviades L. 2011. Correo electrónico de Luz Caviades para Alberto Mendoza. Disponible en: www.tbperu.org/2012/11/homenaje-luz-caviades-creadora-del-mods.html .
84. Asencios L., Acurio M., Quispe N., Vasquez L. SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS DE Mycobacterium tuberculosis MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS). LIMA, 2011.
85. Tratamiento para la enfermedad de tuberculosis. Esquemas de tratamiento recomendados 2013. Disponible en: <http://www.cdc.gov/tb/esp/topic/treatment/tbdisease.htm> Acceso el 27 de Octubre 2013.
86. Equipo Técnico PNCT y PRCT's. Manual de Normas Técnicas en Tuberculosis. 2ed. La Paz: Abbase; 2009.
87. Tinción de Ziehl-Neelsen, disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Tinci%C3%B3n_de_Ziehl-Neelsen. Acceso el 17 de mayo de 2013.
88. Tinción de Ziehl-Neelsen, disponible en: <http://www.buenastareas.com/ensayos/Tincion-De-Ziehl-Neelsen/2040577.html> acceso el 17 de mayo de 2013.
89. Lowenstein, E. 1933. *Ann. Inst. Pasteur.*; 50:161.
90. Lowenstein, E. 1931. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten.*; 120:127.
91. Schaeffer, W.B. 1952. Growth requirements of dysgonic and eugonic strains of *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*. *J. Exp. Med.* 96(3): 207-219.
92. Löwenstein - Jensen Medio Base. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/lowensteinjensen.htm> Acceso el 26 de mayo 2013.

93. LABORATORIOS BRITANIA S.A. disponible en: http://britanialab.com/productos/_inserto_es.pdf Acceso de abril 2013.
94. MEDIO OGAWA-KUDOH - cat.01014. s.l. : Bio-Bacter. Medios y reactivos , 2007.
95. Hardy TB MODS (Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay) Kit. Hardy Diagnostics, A culture of Servie. Santa Maria. USA. Sitio web: www.HardyDiagnostics.com.
96. TB Prep Kit Red disponible en: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/CatNav.aspx?oid=8187&prodoid=U22 Acceso 30 de mayo 2013.
97. Steingart, K. R., A. Ramsay, and M. Pai. Optimizing sputum smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Expert Rev. AntiInfect.* 2007. Ther. 5:327-331.
98. Getahun, H., M. Harrington, R. O'Brien, and P. Nunn. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource -constrained settings: informing urgent policy changes. 2007. *Lancet* 369:2042-2049 .
99. Ramírez E. Escobedo L. Tuberculosis nuevos metodos de diagnostico. Disponible en: http://hgm.salid.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/neumo/confe_04.pdf Acceso 26 de septiembre 2013.
100. Barrera L., Malbran CG. Manual para el Diagnóstico de la Tuberculosis. 2da parte. Organizacion Panamericana de la salud. 2008 .
101. Salcedo N, Ceballos V, Guillén L, Pimentel L. Detección de Mycobacterium tuberculosis por observación microscópica y suseptibilidad a drogas para el diagnóstico rápido de la tuberculosis. 2013 Disponible en: www.bioline.org.br/request?va13004 .
102. Mayta, H., R. H. Gilman, F. Arenas, T. Valencia, L. Caviedes, S. H. Montenegro, E. Ticona, J. Ortiz, R. Chumpitaz, C. A. Evans, D. L. Williams, and the Tuberculosis Working Group in Peru. 2003. Evaluation of PCR based universal heteroduplex generator assay . as a tool for rapid detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Peru. *J. Clin. Microbiol.* 41:5774-5777.
103. Minh DT, Ngoc NT, Kiet VS, Wolbers M, Thanh HT, Jeremy Day, et al. Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in HIV-Positive Patients by Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay. *J. Clin. Microbio.;* 2010 Dic; 42(12):4573-4579.
104. Lipsky, G. J., J. Gates, F. C. Tenover, and J. Plorde. 1984. Factors affecting the clinical value for acid-fast bacilli. *Rev. Infect. Dis.* 6:214-222.

105. Asencio L, Quispe N, Vásquez L. Procedimiento para el control de calidad externo de la prueba rápida MODS (Microscopic Observation Direct Susceptibility) de sensibilidad a los fármacos antituberculosos. Lima. 2012.
106. Park W., Bishai W., Chaisson R., y Dorman S. 2002. El rendimiento de la observación microscópica de Drogas Ensayo de susceptibilidad en las pruebas de susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 4:4750-4752.
107. Vargas, D., L. Garcia, R. H. Gilman, C. Evans, E. Ticona, M. Navincopa, R. F. Luo, L. Caviedes, C. Hong, R. Escombe, and D. A. J. Moore. 2005. Diagnosis of sputum -scarce HIV-associated pulmonary tuberculosis in Lima Peru. *Lancet* 365:150-152.

ANEXO 1. MICROSCOPIO DE LUZ INVERTIDA



ANEXO 2. SOLUCIÓN DIGESTIVA (TB PREP KIT RED).



ANEXO 3. TAMPÓN FOSFATO PBS PH 6,8



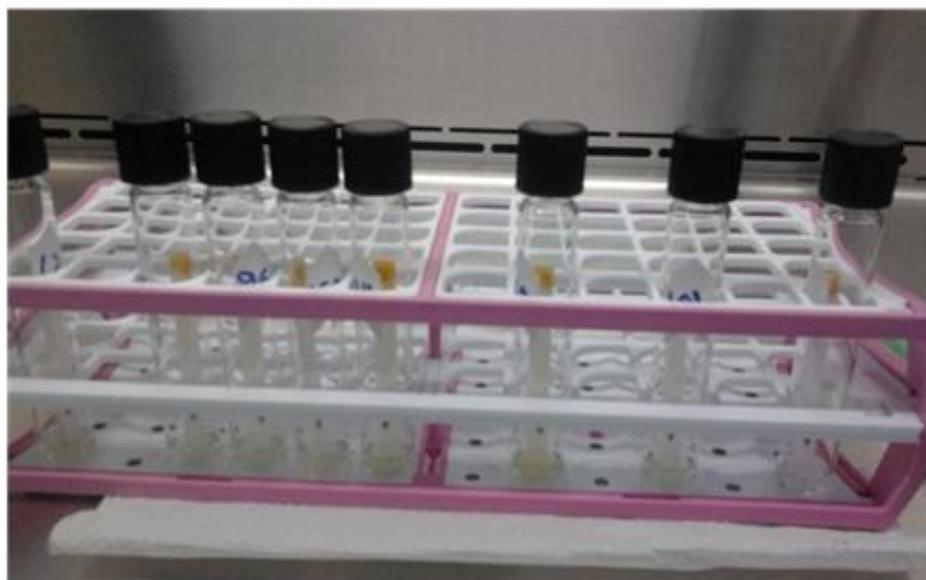
ANEXO 4. CULTIVO LOWENSTEIN JENSEN COMERCIAL



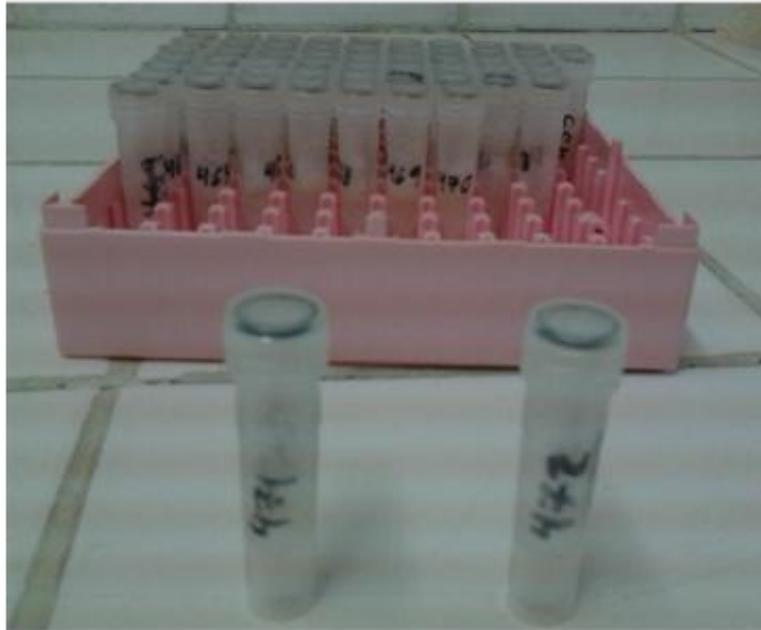
ANEXO 5. TEST DE NIACINA, TIRA DE ANÁLISIS DE ÁCIDO NICOTÍNICO PARA TB



ANEXO 6. TEST DE NIACINA, CAMBIO DE COLOR DEL EXTRACTO



ANEXO 7. CRIOTUBOS UTILIZADOS PARA EL BACK UP DE LAS MUESTRAS



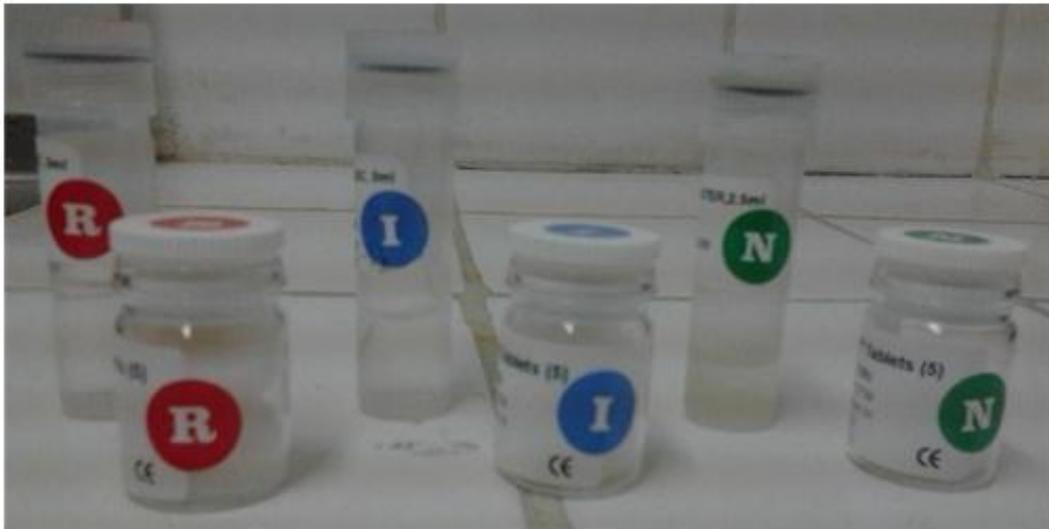
ANEXO 8. TUBOS UTILIZADOS PARA LA PREPARACIÓN DE CONTROLES POSITIVOS. A la izquierda esta TB Diluting Fluid y a la derecha está el tubo con agua y Tween



ANEXO 9. ESCALA DE MC FARLAND N°1



ANEXO 10. ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS, RIFAMPICINA (R), ISONIAZIDA (I) Y PANTA (N)



ANEXO 11. PLACAS MODS SELLADAS CON TAPAS DE SILICONA Y COLOCADAS EN BOLSAS ZIPLOCK

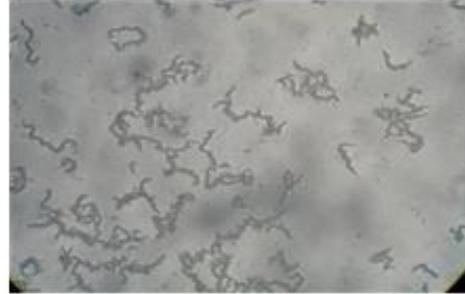


ANEXO 12. DESARROLLO DE M. TUBERCULOSIS EN MODS, SEGÚN DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA. VISTA EN AUMENTO DE 20X A LA IZQUIERDA Y 10X A LA DERECHA.

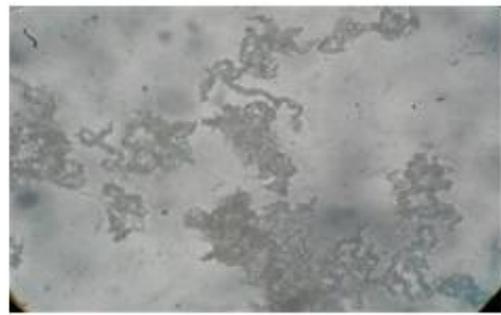
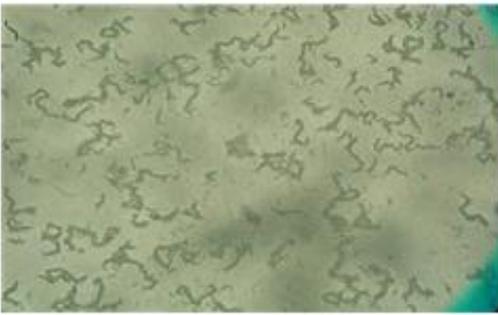
Día 5-7



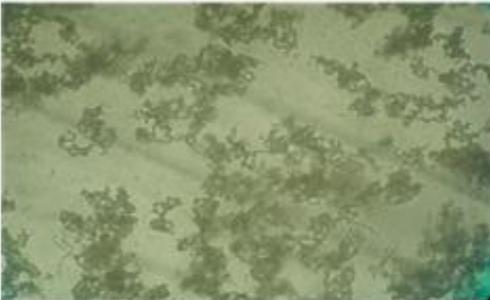
Día 8-10



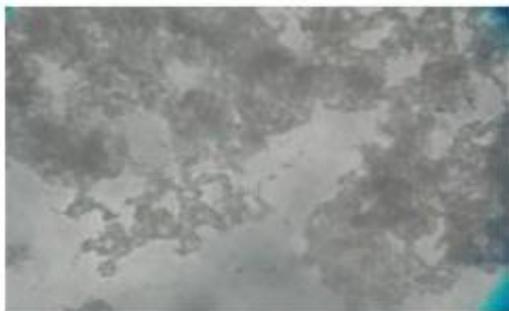
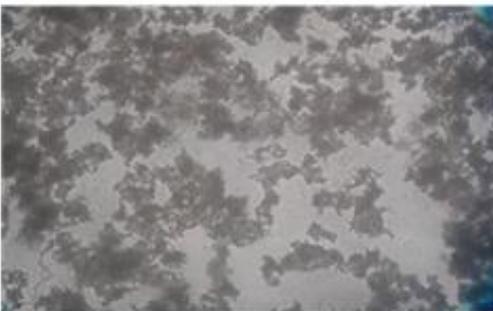
Día 11-14



Día 15 - 18



Día 20-21



ANEXO 13. FORMULARIO UTILIZADO PARA RECOLECTAR DATOS

FORMULARIO

DATOS DEL PACIENTE

Nombre y apellido: ...

Nº registro (SELADIS-UB): ...

...Código del paciente: ...

Lugar de envió: ...

.. código BK:.....Código cultivo: ...

Género: M () F () Edad:...

Fecha envió de muestra: ...

.Fecha recolección de muestra: ...

DATOS DE LA MUESTRA

Fecha toma de muestra:

	Día	Mes	Año	Baciloscopía			
1ra				-	+	++	+++
2da				-	+	++	+++
3ra				-	+	++	+++

Calidad de la muestra:

Volumen de esputo en el MODS: < 2ml (); ≥ 2ml()

RAZÓN SOLICITUD DE CULTIVO

1. Caso NUEVO de TB (no recibió tratamiento previo de TB): si () no ()

2. En caso de NO ser un caso nuevo, cual es el motivo de estudio:

Abandono		Control	
Fracaso terapéutico		Contacto	
Recaída		Sospecha de resistencia	

RESULTADO DEL CULTIVO

Medio de cultivo	Fecha de siembra	Resultado			Día de desarrollo		
		Positivo	Negativo	Contaminado	20	40	60
Lowenstein Jensen					20	40	60
Stonebrink					20	40	60
Ogawa					20	40	60
MODS							

Resultado Test de Niacina: negativo (), positivo ()

ANEXO 14. CULTIVOS LOWENSTEIN JENSEN COMERCIAL CONTAMINADOS.

