



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”

Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis, Lepra y
Micobacterias

**Validación del método de Petroff modificado con solución salina en la
decontaminación de muestras pulmonares para el diagnóstico de micobacterias**



AUTOR: Lic. Grechén Caridad García León



Trabajo de Tesis para optar por el Título de Master en Bacteriología-Micología

La Habana

2018

“Año 60 de la Revolución”



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”

Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis, Lepra y
Micobacterias

**Validación del método de Petroff modificado con solución salina en la
decontaminación de muestras pulmonares para el diagnóstico de micobacterias**

AUTOR: Lic. Grechén Caridad García León

TUTORES: Dra. María Rosarys Martínez Romero, MSc.
Lic. Lilian María Mederos Cuervo, MSc.

Trabajo de Tesis para optar por el Título de Master en Bacteriología-Micología

La Habana

2018

“Año 60 de la Revolución”

“Si el número de víctimas cobradas por una enfermedad constituye la medida de su importancia, entonces todas las enfermedades, especialmente las enfermedades infecciosas más temidas, como la plaga bubónica, el cólera asiático, etc., deben colocarse muy atrás de la Tuberculosis”

Robert Koch, 24 marzo, 1882

***A MIS ABUELOS Y MI TIO WICHO QUE ESTAN EN EL CIELO
PROTEGIENDOME Y AYUDANDOME, BESOS Y
BENDICIONES.....***

AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco al Omnipotente, Omnipresente y Omnisciente Dios por su gran protección y bendición.

Seguidamente, debo decir que en la batalla de la vida, recibimos apoyo de personas lejanas o cercanas, agradecerles siempre de una forma u otra su ayuda por este camino largo de la vida.

Agradecerles a mis padres por permitirme nacer, quererme y apoyarme en todo los momento de mi vida; a mi esposo porque gracias a él pude llegar hasta donde estoy le debo mi superación como profesional, a mis hermanas por darme el apoyo que siempre he necesitado tanto espiritual como material; a mi tío Cortico; a mis bebas que las amos con toda mi vida, que siempre he querido ser un gran ejemplo para ellas como madre, mujer y trabajadora.

A mis compañeras del 2 piso, las que realmente me quieren y se sienten contentas por haberme graduado de Master, no menciono nombres para que no se sientan celosas pero ellas saben quiénes son (gracias y bendiciones para ustedes) y en especial a mi tutora Rosy por tener una gran paciencia conmigo ayudarme a salir adelante con mi tesis y darme apoyo, a Misle mi amiga de muchos años en los tiempos buenos y malos, compañera de cubículo y de estudio; a mi viejito lindo Migue por enseñarme las experiencias del laboratorio y de la vida; a Lily, una gran profesora y compañera del laboratorio (gracias por ayudarme en mi superación profesional) y a los demás integrantes del laboratorio.

A todos mis compañeros de carrera del IPK y mis nuevas compañeras de la maestría: Naty, Irina, a mis compañeros de la lejana China (Deisi y Hermes) los voy a extrañar.

A mis suegros, cuñados y sobrinas.

Por favor si me queda alguien por mencionar que me disculpe.

Dios los bendigas a todos.

Gracias

Existen diferentes métodos de descontaminación de muestras pulmonares para el diagnóstico de micobacterias. El Programa Nacional de Control (PNCTB) recomienda el petroff modificado con solución salina (PM SS), pero no existen evidencias documentadas que avalen este método. El propósito del estudio fue validar el PM SS comparado con los recomendados por las normas internacionales. Se realizó un estudio de validación. Se analizaron 100 muestras pulmonares recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Tuberculosis del IPK de abril 2014-Enero 2017. La muestra se dividió en 3 alícuotas y se descontaminaron por 3 métodos; posteriormente se inocularon en los medios de cultivo sólido y líquido. Se compararon los resultados del cultivo en cuanto a: tiempo de detección de crecimiento (TDC), tasa de contaminación (TC) y % de positividad, además se calcularon indicadores de desempeño (ID). Se comparó el PM SS y petroff modificado con solución tampón en Löwenstein Jensen: el TDC, % de positividad y TC se comportó de forma similar y la sensibilidad (93,75%), concordancia (96,47%) e índice de youden (0,91) fueron elevadas. Al comparar el PM SS con el N-Acetil-L-Cisteína, las variables no mostraron diferencias significativas y los ID se comportaron por encima del 93%, para el medio sólido y líquido. Se demostró que el PM SS puede ser utilizado para descontaminar muestras pulmonares para el cultivo sólido y constituye un soporte para el PNCTB que lo recomienda en la red de laboratorios de Cuba; además lo avala como alternativa para su uso en el pretratamiento de las muestras pulmonares para el medio líquido (Bact Alert 3D).

	Página
I. INTRODUCCIÓN	2
II. OBJETIVOS	7
III. MARCO TEÓRICO	9
III.1.La tuberculosis a través de la historia	9
III.2.Epidemiología de la Tuberculosis	11
III.3.Situación Epidemiológica en Las Américas	12
III.4.Evolución de la tuberculosis en Cuba	13
III.5.Taxonomía y características generales de las micobacterias	14
III.5.1.Taxonomía	14
III.5.2.Características generales de las micobacterias	15
III.5.2.1.Morfología e identificación	15
III.5.2.2.Características de las micobacterias	15
III.5.2.3.Estructura de la pared celular	15
III.6.Diagnóstico de micobacterias	18
III.6.1.Muestras clínicas	18
III.6.2.Métodos presuntivos	18
III.6.2.1Baciloscopía	18
III.6.2.2Tinciones	19
III.6.2.3Métodos de descontaminación para el tratamiento de las muestras clínicas	20
III.6.3.Métodos confirmatorios	20
III. 6.3.1Cultivo	20
III.6.3.1.1Cultivo Bacteriológico	20
III.6.3.1.2.Cultivo automatizado	21
III.7.Otras técnicas de identificación	23
III.7.1.Identificación basada en inmunocromatografía	23
III.7.2.Técnicas moleculares para la identificación de Micobacterias	24
III.7.2.1.Ensayos con Sondas en Línea (LPA)	24
III.7.2.2.Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP, del inglés, <i>Loop Mediated Isothermal Amplification</i>)	26
III.7.2.3.Prueba de amplificación directa de <i>Mtb.</i> (AMTD, <i>Amplified M. tuberculosis Direct test</i> , por sus siglas en inglés).	27
III.7.2.4.Tests clásicos para la amplificación de ácidos nucleicos (NAATs, del inglés, <i>Nucleic Acid Amplification Tests</i>)	28
III.7.3.Gene Xpert MTB/ RIF (Xpert MTB/ RIF)	28
III.7.3.1Gene Xpert Omni	29
III.7.3.2.Xpert MTB/ RIF Ultra (Xpert Ultra)	29
III.7.3.3.Xpert XDR	30
III.7.4.Secuenciación del genoma completo (WGS)	30

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	32
IV.1. Definición del universo y muestra de estudio	32
IV.2. Elaboración de medio de Cultivo Löwenstein Jensen (LJ)	32
IV.3. Procesamiento de las muestras	32
IV.3.1. Procedimiento de la Baciloscopía	32
IV.3.1.1. Extensión de la lámina	32
IV.3.1.2. Tinción de Zielh Neelsen:	33
IV.3.1.3. Codificación de la lámina	33
IV.3.2. Procesamiento y cultivo de las muestras.	33
IV.3.2.1. Procedimiento para la validación del método de Petroff modificado con solución salina.	33
IV.3.2.1.1. Decontaminación por el método de Petroff modificado con solución salina.	34
IV.3.2.1.2. Decontaminación por el método de Petroff modificado con solución tampón.	34
IV.3.2.1.3. Decontaminación de las muestras por el método del NALC.	35
IV.3.2.1.4. Cultivo en medio sólido Löwenstein Jensen (LJ).	35
IV.3.2.1.5. Cultivo en Medio Líquido (Sistema automatizado Bact ALERT 3D)	36
IV.4. Procedimiento para realizar la tira SD BIOLINE.	37
IV.5. Procesamiento de los datos	37
IV.5.1. Análisis de la información	38
IV.6. Aspectos éticos	38
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
VI. CONCLUSIONES	53
VII. RECOMENDACIONES	55
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
IX. ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Esta enfermedad constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial y se reportan en países en vías de desarrollo cerca de un 95 % de casos nuevos y 98% defunciones anualmente (1).

Esta enfermedad afecta típicamente al pulmón (TB pulmonar), pero también puede afectar a otros sitios (TB extrapulmonar). El agente causal (*Mtb*) se disemina al medio ambiente a través de aerosoles que expulsan los pacientes infectados al toser, hablar, cantar y reírse, los bacilos pueden permanecer infectantes en el aire durante un gran periodo de tiempo y ser inhalados por otras personas. De un 5 -15% de las personas infectadas con TB, desarrollan la enfermedad durante su vida. Sin embargo, la probabilidad de desarrollar TB es mayor entre las personas infectadas con el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) incrementando el riesgo de transmisión de la enfermedad (2) (3).

La TB es considerada como una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial, situándose por encima del VIH/sida (síndrome de la inmunodeficiencia adquirida). Durante el 2016 la OMS (Organización Mundial de la Salud) reportó 6,3 millones de casos nuevos, 1,3 millones de personas no VIH fallecieron por esta enfermedad y cerca 374 000 muertes entre los VIH positivos. De los casos TB MDR (multidrogoresistente)/ RR (resistente a rifampicina), solo se reportaron 600 000 casos nuevos con RR, 490 000 de ellos desarrollaron TB MDR, por lo que es necesario un diagnóstico oportuno para comenzar con el tratamiento adecuado, y lograr la curación de estos pacientes (4).

I. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de la TB puede hacerse en forma confiable en el laboratorio demostrando la presencia de bacilos en la muestra por medio de la baciloscopia (BK) (diagnóstico presuntivo) y el cultivo (diagnóstico confirmativo), el cual es más sensible que la BK, pues detecta una menor concentración bacilar (mínimo de 10 bacterias viables por mL (mililitro) de esputo). Por otro lado, es la prueba de oro para el diagnóstico confirmativo de la enfermedad y permite determinar la susceptibilidad a las drogas antituberculosas (5) (6).

Mtb es de crecimiento lento (división celular de 24 - 48h), por lo que las colonias en el medio sólido Löwenstein Jensen (LJ) comienzan hacerse visibles a partir de la tercera o cuarta semana de incubación. A esto se le añade que para realizar el procesamiento de las muestras procedentes de sitios no estériles, es necesaria la decontaminación para eliminar la microbiota normal que impediría el desarrollo de las micobacterias, por lo que el diagnóstico es laborioso y demorado (7) (8).

La introducción de nuevas técnicas en los laboratorios de micobacteriología están encaminada a lograr el diagnóstico y detección de micobacterias en muestras clínicas pulmonares y extrapulmonares en un menor tiempo. Durante las últimas décadas, se han desarrollado numerosos sistemas automatizados para la detección del crecimiento de diferentes microorganismos en medio líquido. Algunos de estos sistemas están basados en la detección del crecimiento a través de métodos radiométricos como el BACTEC 460; en métodos colorimétricos para detectar la producción de CO₂ (dióxido de carbono), como BacT ALERT 3D, y algunos utilizan sensores de presión o métodos fluorométricos para determinar el consumo de oxígeno, como el sistema de cultivo ESP II y BACTEC MGIT 960. La mayoría de estos sistemas automatizados presentan

I. INTRODUCCIÓN

tiempos de detección similares y no necesitan de ninguna instrumentación por parte del operador (9-11).

Para el Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones de Tuberculosis, Lepra y Micobacterias (LNRI-TBLM) y el Programa Nacional de Control de la TB (PNCTB) de Cuba constituye una prioridad contar con herramientas que permitan el diagnóstico acelerado de la TB, sobre todo en pacientes con BK negativa y pacientes VIH positivos. El LNRI-TBLM dispone del sistema automatizado Bact ALERT 3D para el cultivo de micobacterias. Este sistema es altamente sensible y no invasivo. Como método de decontaminación de las muestras no estériles, utiliza el N-acetil-L-cisteína (NALC)-hidróxido de sodio, según lo recomendado por el fabricante, pero esta resulta muy caro para países de bajos y medianos recursos económicos (12-14). Para el aislamiento primario y recuperación de las micobacterias se recomienda por las normas internacionales, el uso del medio sólido convencional (LJ) junto con otros sistemas automatizados que utilizan medio de cultivo líquido, como el Bact ALERT 3D (15).

Existen otros métodos de decontaminación para el procesamiento de las muestras pulmonares para el cultivo, que pueden ser utilizados según los recursos de cada laboratorio. Entre ellos podemos citar, el Petroff modificado utilizando como neutralizante solución tampón (PM ST) con pH 6,8 (6), Petroff modificado con solución salina (PM SS), el de agitación y precipitación lenta de Valdivia, Kudoh-Ogawa, entre otros (14).

I. INTRODUCCIÓN

En la red de laboratorios de TB de Cuba se utiliza como medio de cultivo para micobacterias el LJ, sin embargo, en el LNRI-TBLM del IPK está disponible también el cultivo líquido (por el sistema Bact Alert 3D). Para la decontaminación de las muestras pulmonares se recomienda por el PNCTB el uso el PM SS, antes de la inoculación a ambos métodos de cultivo. Sin embargo, en Cuba, no existen evidencias documentadas de la concordancia de este método con los recomendados por las normas internacionales, además hasta la fecha no se había podido validar el método (PM SS) por falta de insumos y reactivos necesarios. El LNRITBLM está inmerso en la implementación de un sistema de gestión de calidad. Como exigencia propia del laboratorio, se propuso realizar este estudio para poder disponer de evidencias objetivas que avalen el uso del PM SS, y que este cumpla con los requisitos para el uso específico propuesto.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

- ✦ Validar el método de descontaminación de Petroff modificado con solución salina en muestras pulmonares de pacientes sintomáticos respiratorios.

- ✦ Comparar el método de Petroff modificado con solución salina con el método de N-Acetil-L-Cisteína en medio de cultivo sólido y líquido.

MARCO TEÓRICO

III.1. La tuberculosis a través de la historia

La historia de la TB es tan remota y tan larga, que la más somera referencia a sus hitos mayores llenaría todo un artículo en la más prestigiosa revista médica. Se han encontrado lesiones tuberculosas en momias egipcias de las dinastías más antiguas, alrededor de 5000 años a. C. (16). El esqueleto momificado de Ammon, 1000 años a. C. evidenció con sus deformidades, la increíble predilección de esta dolencia por las estructuras óseas. De tal forma el axioma “*Las Momias Egipcias Contaron la Historia*”, es la realidad inexorable de una enfermedad que no distinguió entre estratos sociales, rangos, actividades, fama o fortuna (17) (18).

Comenzando el siglo XIX aparecen las figuras de dos grandes médicos, amigos entre sí y ambos padecían de TB: Teophile Hyacinthe Laennec (1781-1826) y Gaspard Laurent Bayle (1774-1816). Laennec, el célebre patólogo francés que inventó el estetoscopio en 1819, realizó sin aprensiones minuciosas autopsias a los tuberculosos y concluyó que el tubérculo constituía un signo de la enfermedad, por lo que dondequiera que hubiera tubérculos había TB, lo que dio lugar a que posteriormente comenzara a llamarse de esa manera, convirtiéndolo en un gran pionero en el campo de esta patología, con magníficas descripciones que se han hecho clásica en la actualidad. Por su parte, Bayle desarrolló el concepto moderno de la TB como un proceso mórbido progresivo, luego de concluir casi un millar de autopsias (2) (18) (19) (20).

Si bien en la historia de las investigaciones etiológicas de la TB el mérito mayor se le atribuye a Robert Koch, el propio científico reconoció predecesores y contemporáneos que realizaron valiosos aportes. En 1720, Benjamín Merton postuló en “*A new theory of*

III. MARCO TEÓRICO

consumption” (La nueva teoría de consumo), que la TB pudiera ser causada por “diminutas criaturas”. En 1784 Natalio Saliceto anunció la transmisión aérea de la enfermedad utilizando una frase de Rousseau: “*Los hombres se envenenan mutuamente al aglomerarse*”. En 1840 Jakob Henle postuló magistralmente el origen animado de las infecciones y estableció algunas bases para la identificación de los microorganismos. Ya en 1857, Buhl, tras un exhaustivo estudio anátomo-patológico de la forma diseminada de la enfermedad (miliar), concluyó que era de carácter infeccioso. El cirujano militar francés Jean Antoine Villemin (1827-1892) publicó en 1865 sus trabajos sobre conejos inoculados con material tuberculoso y afirmó que la “TB era una enfermedad específica y su causa un agente inoculable” (21).

El 24 de marzo de 1882, en Berlín durante la histórica reunión de la Sociedad de Fisiología, Robert Koch dio a conocer el descubrimiento del bacilo tuberculoso. Su discurso, publicado el 10 de abril en la página 21 del Berliner Klinischen Wochenschrift, constituye uno de los “clásicos” de la microbiología (21-23). Semanas después, Paul Ehrlich, reconoció y publicó el carácter ácido-alcohol resistente del bacilo y creó la tinción que posibilitó el método diagnóstico de la BK. El nombramiento de tinción de “Ziehl-Neelsen” (ZN) resultó una denominación errónea a favor de Franz Ziehl y Karl Adolf Neelsen, bacteriólogo y patólogo alemanes (24).

Los franceses Albert León Charles Calmette (1863-1933) y Camille Guérin (1872-1961), en 1921 iniciaron un cultivo con una cepa bovina, que tras ensayos sucesivos, se aplicó por primera vez en humanos en 1921, vacunando 120 recién nacidos con tres dosis orales de 2 mg cada una, durante las dos primeras semanas de vida. Tres años después, en 1924, se iniciaba la administración oficial en Francia. También, la

III. MARCO TEÓRICO

tuberculina purificada por Koch en 1897 fue administrada por el médico francés Charles Mantoux (1877-1947), lo cual permitió diferenciar entre individuos infectados y no infectados (24).

La historia de la enfermedad dio un vuelco cuando en 1944 Albert Schatz, Elizabeth Bugie y Selman Waksman anunciaron el descubrimiento de la estreptomicina, en 1952 se incorporó la isoniazida y en 1957 la rifampicina (25).

En la década de los sesenta, Canetti y Grosset estudiaron la población bacteriana existente en las lesiones tuberculosas y la posibilidad de aparición de mutaciones espontáneas para cada fármaco. Así, calcularon que es muy improbable que el bacilo genere mutación simultánea a más de 2 fármacos y por ello los tratamientos se administran con 3 o 4 medicamentos (26).

III.2. Epidemiología de la Tuberculosis

La TB es una enfermedad infecciosa bacteriana producida por el complejo *Mtb* y constituye actualmente una enfermedad con una alta morbimortalidad. Aún en el siglo XXI, continúa recabando la atención a nivel mundial, lo que hace que se planteen grandes retos como el control de la misma y surjan nuevos problemas, como la emergencia de la TB - MDR, por lo que la OMS ha desarrollado un programa específico y ambicioso que pretende su erradicación para el año 2050 (27).

Se estima que la tercera parte de la población mundial está infectada por *Mtb* y que antes de finalizar el presente siglo surgirán 90 millones de casos nuevos, con 30 millones de defunciones. La coinfección con el VIH, representa del 3 - 5 % de los casos (27).

III. MARCO TEÓRICO

La epidemia de TB alcanzó su punto más alto a finales del siglo XVIII en Inglaterra, a principios del siglo XIX en Europa occidental y a finales del siglo XIX en Europa Oriental y América del Norte y del Sur, mientras que en muchas zonas de Asia y África todavía no se ha alcanzado el pico de incidencia, aunque datos recientes de la OMS sugieren que esta ha podido comenzar a remitir también en estas regiones (14).

En el año 2016 se estimó una incidencia de TB de 10,4 millones de casos: 90% fueron adultos, 65% mujeres y 10% pertenecieron a personas viviendo con HIV (74% en África subsahariana). El 56% del total de casos estimados fueron a expensas de 5 países: India, Indonesia, China, las Filipinas y Pakistán (4).

Dentro de las estrategias de la OMS para la eliminación de la TB post 2015, se encuentra: reducir las muertes en un 75% para el 2025 y en un 95% para el 2035, así como lograr la reducción de la tasa de incidencia de esta enfermedad en un 50% y 90% para 2025 y 2035, respectivamente (28) .

III.3. Situación Epidemiológica en Las Américas

Si bien es cierto que la TB es una enfermedad histórica que ha disminuido su incidencia de manera importante en los países occidentales, debido a la mejora de las condiciones sociales y económicas – insalubridad del medio, hacinamiento, marginación, hábitos tóxicos, etc, se la considera aún hoy como la primera causa de mortalidad mundial en condiciones de pobreza y hacinamiento (29).

En general, la Región de las Américas está progresando satisfactoriamente hacia las metas mundiales del control de la TB. En los últimos decenios se realizaron avances importantes en el control de la TB, inicialmente con la estrategia del tratamiento acortado estrictamente supervisado (*DOTS*, por sus siglas en inglés) y más

III. MARCO TEÓRICO

recientemente, con la estrategia Alto a la TB, que permitieron a la Región alcanzar el objetivo de reducción del 50% de la prevalencia, además del objetivo de reducción del 50% de la mortalidad por TB, mientras que la cobertura de tratamiento alcanzó niveles por encima del 75%. A pesar de este logro, la TB persiste, especialmente en poblaciones vulnerables debido a los factores subyacentes de pobreza, inequidad, urbanización acelerada y alcoholismo, así como a los nexos con otras enfermedades, como la infección por el VIH/sida, diabetes y a la presencia de resistencia a medicamentos, entre otros (30) (31).

En 2016, el total de casos notificados en la región de las Américas fue de 222 746, representando un 81% del total de casos estimados (273 574). Para los casos coinfectados con VIH/TB solo se reportó el 68% (20 625) de los 30 483 de casos estimados y solo se notificó el 46% (3 731) de los casos TB - MDR/RR. Además, se estimó que 17 033 personas fallecieron por TB (todas las formas), de ellas 6 267 con coinfección VIH/TB (4).

III.4. Evolución de la tuberculosis en Cuba

En nuestro país, la evolución de la TB de 1971 a 1991 mostró una tendencia descendente como expresión del resultado de la lucha contra esta enfermedad, el fortalecimiento del Sistema Nacional de Salud y las transformaciones socioeconómicas operadas en el país. El reto de PNCTB es lograr una incidencia anual de 1 bacilífero por cada millón de habitantes, equivalente a una prevalencia de infección anual en la población general del 1 % (14).

III. MARCO TEÓRICO

Para mejorar algunas deficiencias, el PNCTB actualizó el manejo de casos en función de las nuevas pautas internacionales y se fortaleció el trabajo interprogramático en todos los niveles del sistema de salud (14).

El PNCTB en Cuba ha logrado disminuir la tasa de incidencia de la TB pero en los últimos años mantiene un estancamiento en valores cercanos de 6,1 x 100 mil habitantes. Debemos señalar que la mortalidad por TB no constituye un problema ya que en los últimos 10 años las tasas se han mantenido por debajo en 1 x 100 000 habitantes, no obstante se ha notado un ligero incremento de la mortalidad asociada al VIH (14).

Cuba es el país con más baja tasa en América y con condiciones en su sistema de salud para alcanzar la eliminación de la TB. Sin embargo se debe señalar que entre los años 2004 y 2012 la incidencia de TB en niños menores de 15 años se incrementó de 0,3 a 0,9 x 100 mil habitantes (32). El comportamiento actual indica un detenimiento del incremento de la enfermedad, al cierre de 2017 se registraron 659 casos nuevos y 54 recaídas, para una tasa de notificación 6,3 x 100 mil habitantes, cifra similar a los años precedentes (33).

III.5. Taxonomía y características generales de las micobacterias

III.5.1. Taxonomía.

Las micobacterias pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae*, está incluida en el orden *Actinomycetales* y posee un solo género: *Mycobacterium*, donde se encuentran más de 100 especies ácido-alcohol-resistentes. Las micobacterias en general varían mucho en su morfología, desde formas cocoides a largos filamentos, ocasionalmente forman ramificaciones verdaderas que se observan en cultivos enriquecidos (34).

III.5.2. Características generales de las micobacterias

III.5.2.1. Morfología e identificación

En los tejidos, los bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) se observan como finas estructuras rectas cilíndricas que miden $0,4 \times 3 \mu\text{m}$, aproximadamente. En medios artificiales se les identifica por tener formas cocoides y filamentosas, cuya morfología varía con la especie (34).

III.5.2.2. Características de las micobacterias

Las micobacterias son aerobios obligados y obtienen energía de la oxidación de muchos compuestos simples de carbono. La mayor tensión de CO_2 intensifica la proliferación. Las actividades bioquímicas no son características y la rapidez de proliferación es mucho menor que la de muchas bacterias. El tiempo “en que se duplica” el número de bacilos tuberculosos es de 18 h. Las formas saprófitas tienden a multiplicarse con mayor rapidez, proliferan satisfactoriamente a 22 a 33°C , producen más pigmento y tienen una propiedad acidorresistente menor que las formas patógenas (34).

III.5.2.3. Estructura de la pared celular

La pared de las micobacterias induce hipersensibilidad tardía y moderada resistencia a la infección y puede sustituir a la micobacteria íntegra en el medio aditivo o coadyuvante de Freund (34).

A. Lípidos

Las micobacterias cuentan con abundantes lípidos; incluyen ácidos micólicos (ácidos grasos de cadena larga de 78 a 90 carbonos), ceras y fosfátidos. En la célula, los lípidos en gran medida están unidos a proteínas y polisacáridos. El dipéptido muramilo

III. MARCO TEÓRICO

(proveniente del peptidoglucano) en combinación con ácidos micólicos son los responsables de la formación de granulomas y los fosfolípidos inducen la necrosis caseosa (34).

La composición lipídica de la pared celular son los que dan la propiedad de ácido alcohol resistencia. Por otro lado, el análisis de los lípidos por cromatografía gaseosa indica características que facilitan la clasificación de especies diferentes. Las subespecies o cepas virulentas de bacilos tuberculosos forman “cordones serpentinos” microscópicos en que los bacilos acidorresistentes están dispuestos en cadenas paralelas. La formación de cordones guarda relación con la virulencia, de los bacilos virulentos se ha extraído con éter de petróleo un “factor de cordón” (trehalosa 6,6'-dimicolato) que inhibe la migración de leucocitos, causa granulomas crónicos y a veces actúa como un “coadyuvante” o estimulante inmunológico (34).

B. Proteínas

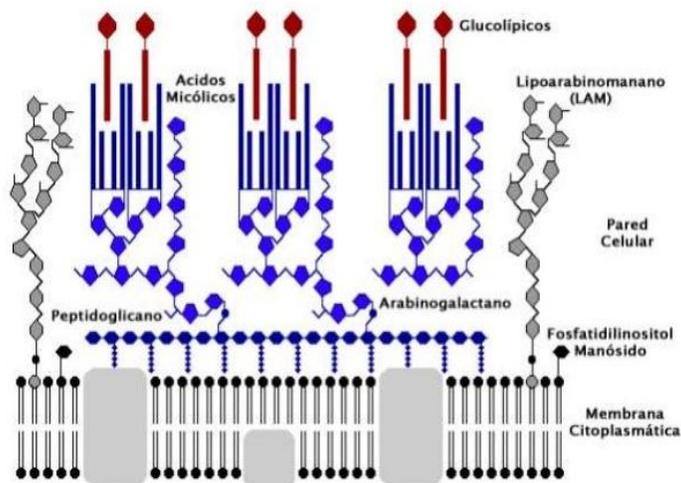
Cada tipo de micobacteria contiene proteínas que desencadenan la reacción tuberculínica. Las proteínas fijadas a una fracción cética, después de ser inyectadas inducen sensibilidad a la tuberculina. También estimulan la formación de diversos anticuerpos (34).

C. Polisacáridos

Las micobacterias contienen diversos polisacáridos, aunque no se ha dilucidado su participación en la patogenia de la enfermedad. Inducen el tipo de hipersensibilidad inmediata y pueden actuar como antígenos en reacciones con suero de personas infectadas (34).

III. MARCO TEÓRICO

La composición de la pared bacteriana hace que la célula sea escasamente permeable, lo que conlleva a la ineficacia de muchos agentes antimicrobianos, además, la pared presenta unas características tintoriales especiales como la propiedad de resistencia a la decoloración por ácido alcohol, por la que se les llama BAAR. Las bacterias del complejo *Mtb* pueden sobrevivir durante semanas o meses en objetos inanimados siempre que no reciban luz solar, pero no puede replicarse si no se encuentra en tejidos humanos o de otros animales de sangre caliente (35). Poseen una importante resistencia a ácidos, álcalis y desinfectantes químicos aunque mueren fácilmente si se superan los 65 °C al menos durante 30 minutos y por la acción de la luz ultravioleta del sol. El frío o la desecación no son eficaces para destruir el bacilo y viven largo tiempo en el esputo seco (34).



Estructura de la pared de las micobacterias. Disponible en:

<https://www.google.com/search?q=imagenes+de+pared+de+las+micobacterias&client=firefox-b&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwiBsuW1jNvZAhWHUt8KHSzLBq0QsAQIJQ&biw=1360&bih=631#imgrc=bLic6E2LcWfNvM>

III.6. Diagnóstico de micobacterias

III.6.1. Muestras clínicas

Para que el laboratorio pueda obtener resultados confiables es necesario que se ejecuten las técnicas correctamente y que las muestras sean adecuadas, entendiéndose como tal las que provienen del sitio de la lesión que se investiga, obtenida en cantidad suficiente (3 - 5 mL), colocada en un envase de cierre hermético, transparente y a prueba de fugas. La muestra debe de estar correctamente identificada y conservada, además debe de transportarse al laboratorio para su procesamiento antes de los 7 días de haber sido recolectada, preferentemente antes de comenzar con el tratamiento (5).

La muestra más examinada es el esputo debido a que, la tuberculosis pulmonar es la forma clínica más frecuente. Sin embargo, dado que la enfermedad puede manifestarse en cualquier órgano, con menor frecuencia puede requerirse la investigación de muestras muy variadas como: orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido ascítico, sangre, pus de cavidades abiertas, biopsias, heces fecales (5).

III. 6.2 Métodos presuntivos

III. 6.2.1 Baciloscopía

La BK es una técnica sencilla, fácil de realizar y constituye la herramienta de elección para el diagnóstico rápido y el control del tratamiento de la TB pulmonar, especialmente en países de alta carga. Sin embargo, su sensibilidad es baja, porque para que sea positiva necesita de cinco mil a diez mil bacilos/mL de expectoración para que tengan un 50% de posibilidades de ser detectados al microscopio; sólo cuando el número de bacilos alcanza más de 100 000 por mL, podemos esperar que las BK sean

consistentemente positivas, siendo especialmente baja en los pacientes con VIH y en niños, poblaciones que constituyen la mayoría de casos de la enfermedad en gran parte de los países del África subsahariana (5) (36) (37).

III. 6.2.2 Tinciones

La ácido-alcohol resistencia es la propiedad que tienen las micobacterias de captar en su pared fucsina fenicada (de color fucsia) o auramina (amarillo fluorescente) y retenerla aun con la acción de decolorantes, como la mezcla de ácido y alcohol (5).

Las técnicas de coloración se han mantenido sin modificaciones en el tiempo. La tinción de ZN es la técnica comúnmente usada en el diagnóstico de rutina, tiene una sensibilidad del 74% y especificidad del 98% (38) (39).

Las micobacterias tienen la capacidad de unir en su superficie sustancias fluorescentes como la auramina y rodamina, esta característica ha permitido que puedan observarse con en el microscopio de luz ultravioleta, emitiendo una fluorescencia amarillo o naranja, dependiendo del filtro utilizado (40).

Con el desarrollo de las nuevas tecnologías en los laboratorios de micobacteriología, apareció recientemente en el mercado el microscopio de fluorescencia LED (*light emitting diode*, por sus siglas en inglés), el mismo utiliza una luz emitida por un diodo, con un tiempo de vida útil de hasta diez mil horas y no libera productos potencialmente tóxicos si se rompen. La OMS ha evaluado la eficacia de este método que mostró una sensibilidad mayor comparada, con otras microscopías convencionales de luz o fluorescentes, y recomienda en un futuro el reemplazo de las técnicas tradicionales por esta tecnología (15) (41) (42). Las ventajas de la microscopía de fluorescencia LED es

que son de menor costo, emiten luz en casi cualquier tipo de longitud de onda, es más sensible y rápida que la técnica convencional de ZN (43).

Las técnicas de coloración son utilizadas de rutina por su facilidad, rapidez y alta especificidad; sin embargo la sensibilidad es menor a la del cultivo, esta depende de factores tales como: tipo de muestra, número y concentración de micobacterias, técnica de coloración utilizada, tiempo dedicado a la observación, actitud y perseverancia del microscopista ante una muestra sospechosa de TB (44).

III. 6.2.3 Métodos decontaminación para el tratamiento de las muestras clínicas.

Existen diferentes métodos que pueden ser utilizados según los recursos económicos de los laboratorios a nivel mundial: Petroff Modificado con Solución Salina (MP SS), Petroff modificado con solución tampón (PM ST), Método de precipitación y agitación lenta de Valdivia, Kudoh Ogawa, NALC-NAOH, Petroff simple, Método del Ácido Sulfúrico al 4%, entre otros.

III. 6.3 Métodos confirmatorios

III. 6.3.1 Cultivo

III.6.3.1.1 Cultivo Bacteriológico

El cultivo constituye la prueba de referencia para el diagnóstico definitivo de la TB. Mediante el cultivo, es posible aumentar la confirmación del diagnóstico de la enfermedad del 15-20 % del total de casos y del 20 - 30 % de los pacientes con TB pulmonar. Además, detecta a los enfermos de forma temprana, antes de volverse infecciosos (45).

III. MARCO TEÓRICO

Es importante siempre realizar el cultivo aunque la BK sea positiva, pues el valor predictivo positivo de éste es superior al 90 %, además es la técnica que nos permite identificar la especie, por tanto confirma fehacientemente el diagnóstico (46).

Debido al crecimiento lento de las micobacterias, las colonias en el medio sólido LJ, comienzan hacerse visibles a partir de la tercera semana de incubación, por lo que el diagnóstico es demorado y laborioso. El crecimiento de *Mtb* en medios de cultivo micobacterianos tradicionales puede demorar entre dos y ocho semanas, o más (47). Sin embargo cuando se cultiva en medio líquido el tiempo de detección del crecimiento es más rápido (7). El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) recomienda el uso combinado del cultivo líquido y sólido para el cultivo primario (7) (48).

III.6.3.1.2. Cultivo automatizado

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes métodos automatizados para el cultivo de micobacterias. Dentro de ellos se encuentra el Sistema Radiométrico BACTEC-460®TB, MGIT (*Mycobacterium growth indicator tube*, por sus siglas en inglés), Versa TREK, Bact/ALERT 3D, entre otros (45).

Los sistemas de detección de micobacterias MB/BacT y BacT ALERT 3D, utilizados junto con el sistema BacT ALERT MP, proporcionan un sistema de detección de microorganismos y un medio de cultivo con condiciones nutricionales y ambientales adecuadas para recuperar especies de micobacterias aisladas habitualmente en muestras no hemáticas de pacientes (12).

III. MARCO TEÓRICO

El sistema Bact ALERT 3D para el diagnóstico rápido de micobacterias tiene una alta sensibilidad y especificidad, es un sistema no invasivo, permite la monitorización y detección rápida de forma sensible y confiable de las micobacterias en esputo, sangre y otros líquidos corporales. Proporcionan un medio de cultivo con condiciones nutricionales y ambientales adecuadas para recuperar especies de micobacterias aisladas habitualmente en muestras no hemáticas de pacientes. Como método de decontaminación para muestras procedentes de sitios no estériles utiliza el del N-acetil-L-cisteína (NALC) hidróxido de sodio, según lo recomendado por el fabricante, pero tiene como inconveniente que es un reactivo muy caro para ser utilizado en países de bajos y medianos recursos económicos (10) (12) (13).

El fundamento del equipo se basa en la presencia del sensor colorimétrico LES (*Liquid Emulsion Sensor*, por sus siglas en inglés) de alta sensibilidad, además de la reflexión de la luz para monitorear la presencia y producción de CO₂, derivado del metabolismo bacteriano. A medida que se multiplican los microorganismos, el CO₂, difunde a través de la membrana semipermeable y forma iones H, produciendo cambio progresivo del pH, resultando en un cambio de color de azul o verdoso a coloración amarilla, que se refleja en las unidades de reflectancia y en la gráfica que construye el sistema. En el momento de la detección, el número aproximado de unidades formadoras de colonias (ufc) por mililitro es de 10⁶-10⁷. (9) (12) (49).

Otras de las ventajas del sistema se encuentran que es completamente automatizado, reduce costos por aumento de productividad, el monitoreo de las botellas no es invasivo, elimina el riesgo de contaminación cruzada y permite detectar los casos positivos de forma más rápida, el volumen de muestra es flexible, mide objetivamente

el crecimiento microbiano, identifica de forma inmediata las botellas presuntas positivas por combinación de alarmas audibles y visuales, la identificación se realiza por código de barras lo que permite la trazabilidad de las muestras, permite cargar, descargar y localizar fácilmente las botellas en el sistema (9) (49).

Estudios preliminares, han reportado tiempos de detección del crecimiento entre 11 y 13 días como promedio para *Mtb* y de 2-3 días para las micobacterias de crecimiento rápido (9) (49). Aunque se han desarrollado técnicas moleculares, estos métodos aún no han logrado sustituir a la detección, identificación y prueba de sensibilidad dependientes del cultivo (6).

III.7. Otras técnicas de identificación

III.7.1. Identificación basada en inmunocromatografía

En los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías encaminadas a acelerar y simplificar la identificación del complejo *Mtb*, a partir del crecimiento en medios sólidos o líquidos. Actualmente, varias casas comerciales disponen de pruebas para la identificación rápida por ensayo de inmunocromatografía (SD Bioline TB Ag MPT₆₄ Rapid Test, Corea y BD's MGIT TBc ID) que utilizan anticuerpos monoclonales contra el antígeno (Ag) MPT₆₄, presente solamente en este complejo. Estas técnicas son fáciles de realizar, la sensibilidad y especificidad son del 99 % y 100 %, respectivamente. Por otro lado no requiere de personal altamente calificado, ni equipamiento sofisticado para realizar la prueba. La aparición de dos bandas color fucsia (banda control y la banda de la muestra que se está testando), evidencia un resultado positivo al antígeno (50) (51).

III. MARCO TEÓRICO

Determinación de LAM Alere Determine™ TB LAM Ag: ofrece detectar el antígeno LAM (lipoarabinomanano) en muestras de orina para ayudar al diagnóstico de TB más rápidamente que con los métodos tradicionales en personas VIH (+). Su sensibilidad global en población VIH (+) es de 21 a 54%, pero aumenta a 56% si el recuento de CD4 es < 100, con una especificidad de 95% (52).

III.7.2. Técnicas moleculares para la identificación de Micobacterias

Actualmente hay un gran desarrollo de nuevas metodologías para el diagnóstico rápido de TB y TB-MDR que, están siendo evaluadas por su potencial utilidad clínica. Algunas de ellas ya están disponibles en el mercado (52).

Los métodos moleculares ofrecen varias ventajas sobre las técnicas convencionales para la detección e identificación rápida de cepas del complejo *Mtb* y de otras micobacterias, como son: corto tiempo para obtener resultados (5 - 48 horas), confianza y reproducibilidad. El uso de estos métodos moleculares mejora el manejo del paciente y han sido recomendados por la OMS. Las desventajas de la técnica están dadas en los riesgos de contaminación cruzada y que no resulta de utilidad en el control de tratamiento, ya que no distingue entre bacilos viables y no viables (15).

III.7.2.1. Ensayos con Sondas en Línea (LPA)

Los ensayos de LPA (*Line Probe Assays*, por sus siglas en inglés) son pruebas moleculares que utilizan tiras reactivas de nitrocelulosa (tecnología DNA Strip) que contienen regiones moleculares parciales o sondas de los genes de resistencia en estudio (52), dentro de ellas se encuentran:

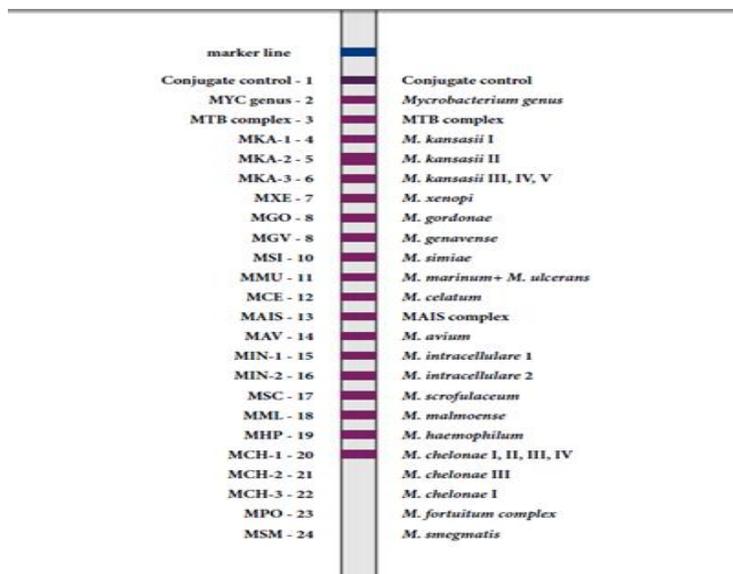
Genotype®MDRTB plus (v 1.0 y 2.0): Esta prueba utiliza tiras reactivas que contienen regiones moleculares parciales de los genes *rpoB*, *katG* e *inhA* fijadas sobre ellas,

III. MARCO TEÓRICO

detectando así mutaciones de resistencia a la rifampicina (*rpoB*) y las principales mutaciones presentes en la resistencia a isoniacida (*katG* e *inhA*). Está basada en una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) múltiple de punto final. Realizada a partir de muestra directa de esputo tiene una sensibilidad de 95,7% para rifampicina; 95,8% para isoniacida y 95,3% para TB-MDR. La misma prueba molecular a partir de cultivos tiene una sensibilidad de 100% para detectar resistencia a rifampicina ;97,5% para isoniacida y 96,9% para TB-MDR (53).

Genoscholar TB-NTM+MDR: permite detectar la resistencia a rifampicina e isoniacida identificando no solo al Complejo *Mtb sino* también a otras micobacterias como *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. kansasii*. Se puede utilizar en muestras directas de esputo o en cultivos positivos, con una sensibilidad de 98,9% para rifampicina y 61,6% para isoniacida, y especificidad de 97,3% y 100% respectivamente (54).

Genotype MTBDRs/: .Esta prueba utiliza la misma tecnología que Genotype®MDR/TB plus, con la diferencia que detecta las mutaciones más frecuentemente asociadas a resistencia a aminoglucósidos (AMG) y fluoroquinolonas (FQ), las dos familias de fármacos de segunda línea cuya resistencia determina la presencia de TB extremadamente resistente (TB-XDR). La sensibilidad global para detectar la TB-XDR es cercana al 80% y se puede realizar desde muestra directa y cultivo positivos (55).



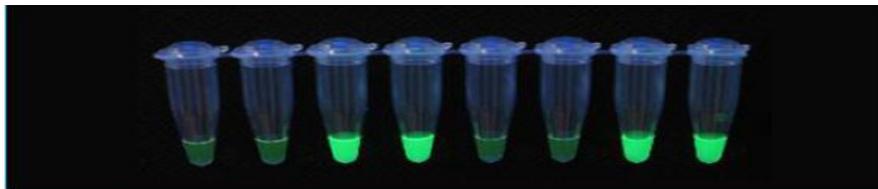
Ejemplo de resultados de TSD de 5 cepas del complejo *Mtb.* (1) cepa susceptible; (2) cepa resistente a RIF con alto nivel de resistencia a la isoniacida; (3) cepa sensible a RIF y bajo nivel de RIF a INH; (4) cepa resistente a RIF y un alto y bajo nivel de resistencia para INH; (5) cepa resistente a RIF y con alto nivel de resistencia a INH.

III.7.2.2. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP, del inglés, Loop Mediated Isothermal Amplification)

Se fundamenta en la nueva plataforma LAMP (Eiken Chemical Co. en Japón). Esta tecnología amplifica un ADN diana bajo condiciones isotérmicas (alrededor de 65°C) y está diseñado para detectar visualmente ADN de muestras clínicas en menos de dos horas, con un mínimo de instrumentación. No hay la necesidad de un paso previo de desnaturalización de la doble cadena a su forma simple. La amplificación y detección se dan en el mismo micro tubo.

Un grupo experto de la OMS concuerda que esta tecnología tiene potencial para ser una herramienta diagnóstica rápida de TB, pero que la evidencia disponible de este ensayo es insuficiente. Actualmente, en 14 regiones la OMS conduce estudios

independientes para probar el ensayo, evaluando su factibilidad y costo-efectividad.
(15,56)



Test de LAMP. Reacciones positivas en dos tubos de la derecha. Los dos tubos de la izquierda son negativos. Adaptado de:
http://www.finddiagnostics.org/programs/tb/find_activities/lamp_assay.html.

III.7.2.3. Prueba de amplificación directa de *Mtb.* (AMTD, *Amplified M. tuberculosis Direct test*, por sus siglas en inglés).

Esta prueba se realiza mediante la amplificación isotérmica mediante una transcripción inversa (TMA) cuya secuencia diana es el gen 16S ARNr y la amplificación se realiza en un bloque térmico. Existen diversos sistemas comerciales; los más utilizados son el ensayo AMTD-2 y el “COBAS Amplicor *M. tuberculosis* test”. Este último es un PCR que amplifica un fragmento de 584 pb del gen 16S ARNr, es totalmente automatizada, puede realizarse directamente a partir de la muestra clínica y los resultados están disponibles entre 6 y 7 horas. La especificidad es aceptable tanto en muestras respiratorias como extrapulmonares, sin embargo, la sensibilidad es variable, siendo más elevada en muestras pulmonares con BK positiva (88 - 100%) que en los especímenes con BK negativa (50- 96%). En muestras extrapulmonares la sensibilidad puede variar entre un 27% y 85% (15).

III.7.2.4. Tests clásicos para la amplificación de ácidos nucleicos (NAATs, del inglés, Nucleic Acid Amplification Tests)

Desde inicios de los años noventa, varias metodologías han sido publicadas para la detección de *Mtb* con la prueba de PCR, usando cebadores oligonucleótidos para amplificar un fragmento de ADN específico para este microorganismo. Estos NAATs pueden arrojar resultados en 3-6 horas e incluyen a aquellos comerciales y a los “hechos en casa”, basados en un protocolo desarrollado en un laboratorio no-comercial. Cada NAATs usa un método diferente para amplifica regiones específicas del ácido nucleico del complejo *Mtb*. Incluyen el GenProbe Amplified *M. tuberculosis* Direct test (AMTD), el Roche Amplicor MTB test, el Cobas Amplicor test, el Abbott LCx test, y el BD-ProbeTec (SDA) test (57). Ninguno de estos ensayos ha sido aprobado para la detección directa de *Mtb* de muestras extrapulmonares. Aunque toda esta tecnología es rápida y ha demostrado excelente especificidad, su desempeño puede variar y todavía su sensibilidad no iguala a la de los métodos basados en el cultivo, especialmente para muestras con BK negativa (52).

III.7.3 GeneXpert MTB/ RIF (Xpert MTB/ RIF)

De las numerosas pruebas disponibles de amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de TB, la prueba de Xpert MTB/ RIF (*Cepheid*, EE. UU.), es una de las más ampliamente evaluadas y que la OMS ha recomendado para su empleo en la detección del complejo *Mtb* y su susceptibilidad a la RIF, basándose en su sensibilidad (95%), especificidad (98%), simplicidad técnica y rapidez (58-60).

Puede proporcionar resultados en menos de 2 horas. La OMS recomendó su uso en diciembre del 2010, para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en adultos y en la

actualidad, está promoviendo la introducción global de esta tecnología (15). Desde 2013, también se ha recomendado para su uso en niños y para diagnosticar formas específicas de TB extrapulmonar, como las biopsias de ganglios y líquido cefalorraquídeo. Esta prueba tiene mejor precisión que la microscopía de frotis de esputo (4).

III.7.3.1 Gene Xpert Omni

Esta prueba utiliza la tecnología Xpert en un equipo portable para un solo cartucho, un dispositivo móvil y baterías recargables. Está indicado para ser empleado en lugares alejados, sin acceso a hospitales y laboratorios, o en centros de salud (52).

III.7.3.2. Xpert MTB/ RIF Ultra (Xpert Ultra)

El ensayo Xpert Ultra fue desarrollado para superar la sensibilidad de Xpert MTB/ RIF en la detección de tuberculosis pulmonar y la precisión para la detección de resistencia a la rifampicina. La sensibilidad mejorada de este ensayo debería permitir un tratamiento más basado en la evidencia, la toma de decisiones en etapas tempranas de la enfermedad, incluso en personas con VIH que puede tener una alta morbilidad y mortalidad por TB a pesar de las cargas bacilares relativamente bajas en el esputo (61).

El Xpert MTB/RIF tiene un límite de detección de 130 ufc/mL, en cambio en el Xpert MTB/ RIF Ultra se han mejorado los software y se realizó la recalibración del sistema óptico para lograr disminuir el límite de detección a 10 ufc/mL, un nivel que es similar o mejor que el del cultivo líquido. Se espera llegar a una sensibilidad mayor al 90%, con una especificidad de 100% en pacientes BK negativos con cultivos positivos (52).

III.7.3.3. XPERT XDR

Esta prueba todavía está en desarrollo y evaluación, permitirá la detección de genes de resistencia para isoniacida, fluoroquinolonas y aminoglicósidos. Estaría recomendado para pacientes que tengan un resultado positivo de TB-RR con el Xpert MTB/RIF o Xpert MTB/RIF ultra (52).

III.7.4. Secuenciación del genoma completo (WGS)

Técnica que compara el genoma del bacilo con bases de datos que contienen todos los marcadores de resistencia conocidos. En teoría, al identificar cualquier mutación de resistencia podría realizarse un tratamiento más adecuado del paciente. El atractivo de WGS para *Mtb* (y otros patógenos) radica en la cantidad de datos proporcionados; con una prueba, un organismo puede ser identificado, detectar mutaciones de resistencia y la cepa se puede colocar en el contexto de la epidemiología local. La sensibilidad de WGS para predecir la resistencia es más alta para isoniacida y rifampicina en 92,8% y 96,2% respectivamente. En cambio, la sensibilidad de WGS para la resistencia a pirazinamida es de sólo 70,9%. La especificidad del WGS es mayor para isoniacida y rifampicina (100% y 98,1% respectivamente) pero para otras drogas como el etambutol, es menor (81,7%) (52).

MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Definición del universo y muestra de estudio

Se realizó un estudio de validación. El universo estuvo conformado por todas las muestras pulmonares de pacientes con sintomatología respiratoria por más de 21 días, recibidas en el LNRITBLM- IPK, durante el período comprendido entre Abril 2016 - Enero 2017. Se excluyeron del estudio las muestras derramadas o no identificadas adecuadamente y las que el volumen fuera inferior a 6 mL.

IV.2. Elaboración de medio de Cultivo Löwenstein Jensen (LJ) (descrito en el anexo 1)

IV.3. Procesamiento de las muestras (Ver Anexo 2):

Las muestras una vez que llegaron al laboratorio fueron procesadas según los procedimientos técnicos de operación del laboratorio (descrito debajo).

Primeramente se realizó BK. Posteriormente la muestra se dividió en 3 alícuotas: para realizar la validación del método de decontaminación de PM SS (comparado con el PM ST); y la comparación entre el método PM SS y el del N – Acetil – L - Cisteína hidróxido de sodio (NALC). Luego de procesadas las muestras por los 3 métodos de decontaminación se inocularon en el medio de cultivo sólido y líquido (Bact ALERT 3D).

IV.3.1. Procedimiento de la Baciloscopia

IV.3.1.1. Extensión de la lámina: Se tomó la partícula útil de la muestra y se realizó la extensión en la lámina portaobjeto con movimientos horizontales, sin tocar los bordes, que ocupó el 2/3 de la lámina. Se dejó secar al aire y posteriormente se fijó en el mechero de Bunsen.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.3.1.2. Tinción de Zielh Neelsen:

- Se adicionó fucsina básica de ZN y se aplicó calor hasta la emisión de vapores dejándose actuar por 5 minutos y se enjuagó con agua.
- Se decoloró con alcohol ácido al 3% por 2 minutos y se enjuagó con agua.
- Se aplicó el azul de metileno al 0,1% por 45 segundos a 1 minuto y se enjuagó con agua.
- Se dejó secar al aire.

IV.3.1.3. Codificación de la lámina: Se realizó según el número de BAAR vistos en 4 líneas.

No. BAAR.	Codificación.
Ningún BAAR en las cuatro líneas	0
De 1 a 5 BAAR en las cuatro líneas recorridas	El propio número
De 6 a 25 BAAR en las cuatro líneas recorridas	6
25 o más BAAR en las cuatro líneas recorridas	7
25 o más BAAR en una línea recorrida	8
BAAR en la mayoría de los campos	9

IV.3.2. Procesamiento y cultivo de las muestras

IV.3.2.1. Procedimiento para la validación del método de Petroff modificado con solución salina.

Para la validación del método se realizó la decontaminación de las muestras utilizando como agente neutralizante la solución salina fisiológica y con la solución tampón (que recomienda la OMS y OPS) (6) (14)

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.3.2.1.1 Decontaminación por el método de Petroff modificado con solución salina (14).

- Por cada 2 mL de muestra, se adicionó 2 mL de NaOH al 4%.
- Se homogenizó exhaustivamente (vórtex).
- Se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente y se agitó ocasionalmente.
- Posteriormente se centrifugó a 3000 gravedades (g) durante 15 min y luego se decantó el sobrenadante.
- Se agregó 15 mL de solución salina fisiológica y se centrifugó nuevamente a 3000 x g durante 15 min y se decantó el sobrenadante.
- Se resuspendió el sedimento en 2 mL de solución salina fisiológica.

IV.3.2.1.2. Decontaminación por el método de Petroff modificado con solución tampón (6).

- A 2 mL de esputo se le adicionó 2 mL de NaOH 4%.
- Se homogenizó exhaustivamente (vórtex).
- Se dejó actuar diez minutos.
- Posteriormente se centrifugó 15 minutos a 3000 g a 25 - 35°C. Se dejó reposar cinco minutos. El tiempo total de contacto con el NaOH 4 % no debe sobrepasar los 30 minutos y descartar el sobrenadante.
- Se agregó 15 mL de solución tampón (pH 6,8) y posteriormente se agitó en vórtex por unos segundos.
- Se centrifugó 15 minutos a 3000 g a 25 - 35°C, se dejó reposar cinco minutos y se descartó el sobrenadante

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

- Se resuspendió el sedimento en 2 mL de solución tampón.

IV.3.2.1.3. Decontaminación de las muestras por el método del NALC (Ver Anexo 3) (62-65).

- En un tubo de centrifuga estéril de 50 mL se adiciono un volumen de 5 – 10 mL de esputo y una cantidad igual de reactivo descontaminante.
- Se homogenizó exhaustivamente (vórtex) de 30 segundos a un minuto y se dejó actuar durante 15 a 45 minutos a temperatura ambiente.
- Se añadió un volumen equivalente del reactivo R3 y se mezcló.
- Se centrifugó a 3000 g durante 20 minutos y posteriormente de decanto el sobrenadante.
- Se resuspendió el sedimento en 1 – 2 mL del reactivo R4.

Una vez procesadas las muestras por los diferentes métodos de descontaminación se procedió a la inoculación en los medios de cultivo sólido y líquido.

IV.3.2.1.4. Cultivo en medio sólido Löwenstein Jensen (LJ):

1. Se inoculó 0,2 mL en dos tubos de LJ y se incubó a 37°C.
2. Se realizó la lectura semanal por ocho semanas. En los tubos donde se observó crecimiento se le realizó tinción de ZN para confirmar la presencia de BAAR.
3. En el caso que la tinción dio positiva a BAAR se realizó la codificación del cultivo, según el número de colonias presentes en el cultivo, como se muestra en la tabla.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

No. de colonias.	Codificación.
Ninguna.	Negativo
1-5	El propio número
6-24	6
25-100	7
Más de 100	8
Crecimiento confluyente	9

4. Posteriormente se procedió a la identificación en especie utilizando el tira SD BIOLINE, ensayo inmunocromatográfico para la detección del Ag MPT₆₄ (presente solo en el complejo *Mtb*).

IV.3.2.1.5. Cultivo en Medio Líquido (Sistema automatizado Bact ALERT 3D).

1. Se descontaminó la parte superior de la botella MP con alcohol al 70%. Se adicionó con jeringa estéril 0,5 mL del antibiótico liofilizado reconstituido previamente en 10 mL del fluido de reconstitución, según las instrucciones del fabricante (12,13).
2. Una vez procesadas las muestras por los tres métodos de descontaminación, por cada uno se inoculó simultáneamente con jeringuilla estéril 0,5 mL de la muestra previamente descontaminada y se descontaminó nuevamente la parte superior de la botella MP con alcohol al 70%.
3. Se cargó al equipo Bact/ ALERT 3D.
4. De las botellas presuntas positivas detectadas por el equipo, se extrajo un mL de la botella y se transfirió a un tubo con tapa de rosca de 15 mL y se centrifugó a 3000 g por 15 minutos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

5. Se decantó el sobrenadante y del sedimento se realizó una tinción de ZN para confirmar la presencia de BAAR.

En los casos donde se confirmó la presencia de BAAR se procedió a realizar la tira SD BIOLINE, para diferenciar *Mtb* de las micobacterias no tuberculosas (MNT). En los casos donde la tinción fue negativa, se transfirió 0,2 mL de la botella a un tubo de LJ y se incubó a 37°C por cuatro semanas. Si en ese tiempo no se obtuvo crecimiento se definió como negativo el cultivo. De haber crecimiento, se realizó la tinción de ZN, si se confirmó la presencia de BAAR se procedió a realizar la tira SD BIOLINE.

IV.4. Procedimiento para realizar la tira SD BIOLINE (Anexo 4) (66)

Procedimiento de la prueba: Se adicionaron 100 µL de la botella MP presunta positiva a micobacterias o 100 µL de la suspensión bacteriana o fluido de condensación en la ventana de la tira para inocular la muestra y se esperó 15 minutos para dar el resultado final.

Interpretación de la prueba.

- Resultado negativo: La presencia de una sola banda (banda control).
- Resultado positivo: La presencia de las dos bandas (banda control y la banda en la sección derecha de la ventana).
- Invalidación de la prueba: cuando no aparece ninguna banda y/o cuando no aparece la banda control, en este caso se repitió la prueba.

IV.5. Procesamiento de los datos: Se recogió la información y confeccionó una base de datos en el programa Microsoft EXCEL XP. Se realizaron las tablas utilizando el mismo programa estadístico. Los resultados se presentaron en tablas de frecuencia y se elaboraron tablas de contingencia entre variables.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.5.1. Análisis de la información: Para el análisis estadístico de los resultados y cálculo de los parámetros de desempeño del método del Petroff modificado utilizando solución salina como agente neutralizante, se utilizó el programa para análisis epidemiológico de datos tabulados EpiDATA (por sus siglas en inglés), versión 3.1 (EpiData Association, Dinamarca), con un intervalo de confianza del 95%. Para el cálculo de los indicadores de desempeño no se incluyeron los cultivos contaminados.

IV.6. Aspectos éticos: El protocolo de investigación fue evaluado y aprobado por la Comisión Científica Especializada de Microbiología (36-17) y el Comité de Ética de Investigación-IPK (Código de aprobación: CEI-IPK 95-17). En el manejo de las muestras y aislados clínicos se tuvieron en cuenta varios aspectos éticos. Por el tipo de estudio que se realizó no se requirió de consentimiento informado de los pacientes que intervinieron en el estudio. El trabajo se llevó a cabo en gabinetes de seguridad clase II, según las normas y procedimientos del laboratorio para el trabajo con micobacterias. De esta manera, se impidió la liberación de microorganismos patógenos al exterior, por lo que dicho trabajo no representa riesgos para la comunidad donde se encuentra enclavado el laboratorio. El personal médico, que atiende a los pacientes con TB, tuvo derecho a conocer los resultados derivados del diagnóstico. Los nombres de los pacientes involucrados se mantuvieron de manera confidencial. El personal encargado tiene conocimiento suficiente de las normas de bioseguridad en el manejo de muestras. En el Anexo 4 se muestra el flujograma de trabajo que se siguió en la investigación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una de las principales prioridades de los Programas Nacionales de Control de la TB a nivel mundial es la detección oportuna de los casos de TB (67). El diagnóstico de esta enfermedad es un paso importante para comenzar el tratamiento adecuado, implementar medidas y lograr un control epidemiológico efectivo (68).

Del total de muestras recibidas en el LNRITBLM para el diagnóstico de micobacterias, solo 100 se incluyeron en el estudio. El mayor número de muestras estudiadas correspondieron a esputos 94 (94%), seguidas de lavados bronquiales 4 (4%), secreción bronquial 1 (1%) y broncoscopia 1 (1%). El 87% (87) de las muestras procesadas correspondieron a pacientes VIH.

La TB es la enfermedad oportunista más común entre los pacientes infectados con el VIH y la de mayor morbilidad entre las enfermedades infecciosas (3) (69) (70). El riesgo de un individuo sin VIH de desarrollar TB puede variar de 5-15% en toda la vida, mientras que en aquellos con coinfección VIH/TB aumenta a 50% durante la vida (3). Esta enfermedad es muy difícil de detectar en las personas seropositivas al VIH, lo que puede contribuir a retrasar el diagnóstico. El dúo VIH/TB sigue siendo uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial y amenazan los programas de control de ambas enfermedades (2) (71).

La TB y el VIH poseen un sinergismo mortal. La infección viral conduce a la declinación de los linfocitos T CD4 que son de crucial importancia en iniciar y mantener la respuesta inmune, por lo que promueve la progresión de una infección por TB reciente o latente. Por otro lado, la TB acelera la evolución VIH al aumentar la carga viral e incrementa la progresión SIDA. Al existir un mayor número de casos de VIH/TB aumenta el riesgo de transmisión y la mortalidad por TB en la comunidad e incrementa

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la demanda al sistema de salud, favoreciendo el desarrollo de formas de TB extrapulmonar y de los pacientes con manifestaciones respiratorias BK negativa (2) (3) (70).

Para la validación el método de Petroff modificado con solución salina (PM SS) contra el Petroff modificado con solución tampón (PM ST), se compararon: el tiempo de detección de crecimiento (TDC), porcentaje (%) de positividad a micobacterias y la tasa de contaminación (TC). El TDC y el % de positividad se comportaron de forma similar para las muestras decontaminadas con PM SS y PM ST. La TC fue ligeramente menor utilizando el PM SS (9%) comparado con el PM ST, siendo esta diferencia no significativa estadísticamente ($p=0,8183$). Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de los resultados del cultivo sólido en Löwenstein Jensen utilizando el método de decontaminación de Petroff modificado con solución salina y Petroff modificado con solución tampón. LNRITBLM, IPK. 2012 – 2017.

Variables	Método de Petroff Modificado		p
	Solución Salina	Solución Tampón	
Tiempo de detección de crecimiento	33,7 días	33,6 días	0,4985
% positividad a micobacterias	17	16	1,000
% tasa de Contaminación	9	11	0,8137

Al tomar la prueba de comparación de medias en el supuesto de que las varianzas son iguales se concluyó que el TDC promedio para el cultivo sólido utilizando el PM SS y PM BF no son significativamente distintas ($p=0,9358$).

Se encontraron escasos reportes en la literatura que comparen el MP SS y PM BF en medio sólido, por lo que este estudio constituye un aporte al conocimiento en esta

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

temática. Los resultados de este trabajo son similares a lo reportado por Martínez y cols en el año 2014, que utilizó el PM SS y obtuvo un TDC promedio de 33,577 días para el LJ, pero abarcó mayor número y varios tipos de muestras clínicas, incluyendo las extrapulmonares y no incluyó otros métodos de descontaminación (72), por lo que la comparación pudiera tener sesgo en la comparación.

En cuanto al porcentaje de aislados, aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas, se obtuvo 1 aislado más utilizando el PM SS en comparación con el PM BF, similares resultados a los obtenidos por Chaudhary y cols, en el 2013, que evaluó estos dos métodos a partir de 50 muestras BK positiva y obtuvo mejores resultados para la recuperación de *Mtb* con el PM SS (73).

En cuanto a la TC, los resultados de este trabajo son inferiores a los alcanzados por Tripathi y cols en el 2014, en una investigación conducida en la India, donde se estudiaron 225 muestras pulmonares y obtuvo un 12% de contaminación con el PM SS (74) y similares a los resultados de Chaudhary y cols en el 2013 que obtuvieron un 8,3% (73).

Se ha reportado que el uso de métodos de descontaminación con concentraciones superiores al 4% reduce eficientemente las tasas de contaminación bacteriana, pero puede eliminar las micobacterias presentes en la muestra y por consiguiente dar como resultados falsos negativos en el cultivo (75). Se considera aceptable en un laboratorio de micobacterias una TC entre 3% - 5% para el medio sólido y de 8%-9% para el cultivo líquido. (8) (76).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los indicadores de desempeño, utilizando del PM SS comparado con el PM ST, que se obtuvieron en este estudio fueron superiores al 93%: sensibilidad 93,75%, especificidad 97,10% y concordancia 96,47%. El índice de youden fue mayor de 0,75 (0,91). Tabla 2.

Tabla 2. Indicadores del método de decontaminación de Petroff modificado con solución salina en el medio sólido Löwenstein Jensen. LNRITBLM, IPK. 2012 – 2017.

Indicadores	Petroff Modificado Solución salina
Sensibilidad (%)	93,75%
Especificidad (%)	97,10%
Concordancia (%)	96,47%
Valor predictivo positivo (%)	93,75%
Valor predictivo Negativo (%)	98,53%
Indice de Youden	0,91

La sensibilidad obtenida con el MP SS en este estudio es similar a lo reportado por Ganoza y cols (77) en el 2008 que analizó 106 muestras pulmonares inoculadas en medio LJ utilizando el PM SS como agente decontaminante, y obtuvo un valor de 95,2%.

Una revisión que realizó Zingue y Cols, en el 2013 en Burkina Faso, sobre comparación de la sensibilidad de varios métodos de decontaminación para muestras pulmonares, concluyó que para el cultivo en LJ utilizando el PM SS, la sensibilidad promedio estuvo alrededor del 60%; los resultados obtenidos en este trabajo fueron superiores a los reportados por este autor, pero no se tuvieron en cuenta otros indicadores (78).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el desarrollo de la micobacteriología se han desarrollado numerosos métodos para la decontaminación de los especímenes provenientes de sitios no estériles para mejorar la recuperación de las micobacterias (79).

La decontaminación de las muestras pulmonares tiene dos objetivos: la eliminación de las bacterias de la flora contaminante, tratando de no eliminar las micobacterias que estén presente en la muestra, y la homogeneización del espécimen para permitir una exposición adecuada de los bacilos (80). Existen diferentes métodos de decontaminación que utilizan, según el tipo de muestra para el diagnóstico, ácidos y bases u otros agentes antibacterianos (81).

El PM fue descrito por primera vez en 1968 por Brian y Baker, y se utiliza ampliamente porque aumenta la sensibilidad del cultivo para el aislamiento de micobacterias y puede utilizarse en concentraciones entre el 2% y el 4% (82) (83) (84). Es usado en países en desarrollo debido a su relativa simplicidad y el hecho de que los reactivos son de fácil adquisición. Las ventajas de los métodos que utilizan el NaOH como agente decontaminante está dado porque proporciona un control eficaz de los contaminantes y el tiempo promedio de procesamiento de una muestra es de aproximadamente 1h (84).

Sin embargo tiene algunas desventajas como es el tiempo de exposición, en esto se debe ser cuidadoso pues al exceder los 30 minutos, los bacilos presentes en la muestra pueden llegar a perder la viabilidad hasta en un 60%, además este método requiere de centrifugación, lo que aumenta su costo (84).

El PM SS es un método simple, menos costoso y es considerado como un candidato potencial para ser evaluado por los programas nacionales control de la TB en países de escasos recursos económicos (80) (85). Por otro lado, el porcentaje de cultivos

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

positivos y la fluidificación de las muestras dan mejores resultados al tratar el esputo con este procedimiento. Algunos autores, plantean que la aparición de las colonias en el medio de cultivo sólido es más rápida y la tasa de contaminación es menor al comparar el PM SS con el método de petroff simple (87). También se ha demostrado su efectividad en relación a otras técnicas de decontaminación en pacientes VIH positivos porque permite aumentar la tasa de detección de casos en comparación con la BK, aumentando la sensibilidad del cultivo de un 35% al 74% (85).

Con el uso del PM SS se obtuvo un TDC (33,7 días) ligeramente inferior que al utilizar el NALC (37,3 días) como agente decontaminante de las muestras pulmonares para ser inoculadas posteriormente en el LJ; en cuanto al % de positividad y TC se comportó de manera similar. Las diferencias entre PMSS y NALC para las tres variables evaluadas no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Tabla 3. Es importante resaltar que por el PM SS se obtuvo un aislado más que por el NALC y la TC fue menor comparada con el NALC.

Tabla 3. Comparación de los resultados del cultivo sólido en Löwenstein Jensen utilizando el método de decontaminación de Petroff modificado con solución salina y NALC. LNRITBLM, IPK. 2012 – 2017.

Variables	Métodos de Decontaminación		<i>p</i>
	PM SS	NALC	
Tiempo de detección de crecimiento	33,7 días	37,3 días	0,4277
% positividad a micobacterias	17 %	16 %	1,0000
%Tasa de Contaminación	9 %	12 %	0,6446

Leyenda: PM SS: Petroff modificado solución salina; NALC: N-Acetil-L-Cisteína

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del TDC, en cuanto al uso del NALC son mayores a los reportados por Amer y cols en la India, año 2016 (86) que estudio a 60 pacientes con alta sospecha de TB pulmonar y obtuvo por el LJ 24,3 días como promedio.

El % de positividad obtenido en este trabajo difieren de los obtenidos por Sharma y cols en un estudio conducido en la India en el 2012 (87), que comparó el método de PM SS y el NALC, utilizando el LJ como medio de cultivo, donde obtuvo una mayor porcentaje de cultivo positivos utilizando el NALC con 19 (63,7%) aislados contra 14 (46,7%) utilizando el PM SS. Esta diferencia pudiera estar dada que Sharma y cols estudiaron solamente 30 muestras de pacientes con sintomatología clínica y lesiones radiológicas altamente sospechosos de TB pulmonar, además de ser este un país de alta carga de TB, por lo que se incrementó la probabilidad de obtener aislados de *Mtb*.

La TC con el PM SS encontrada en este trabajo fue similar a la reportada por Chaudhary y cols (73), en la India en 2013, que obtuvo un 8,3% de contaminación por este método, pero inferiores a los de Tripathi y cols (74) en el 2014, India, que estudio 225 muestras pulmonares y obtuvo un 12% de contaminación, pero este estudio solo comparo el petroff simple y el PM SS. Con el NALC se obtuvo valores superiores (12%) a lo obtenido por Amer y cols con una TC de 6,7% (86).

En la tabla 4 se muestra los resultados de la comparación de los métodos de PM SS y el NALC para la inoculación de las muestras después de decontaminadas, para cultivo en el medio líquido. Similar a lo que sucedió con el medio sólido el TDC, % de positividad y la tasa de contaminación no mostraron diferencias significativas al obtenerse un valor de $p < 0,05$, para todas las variables comparadas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4. Comparación de los resultados del cultivo líquido en el Bact Alert 3D utilizando el método de decontaminación de Petroff modificado con solución salina y NALC. LNRITBLM, IPK. 2012 – 2017.

Variables	Métodos de Decontaminación		<i>p</i>
	PM SS	NALC	
Tiempo de detección de crecimiento	10,72 días	12,21 días	0,3145
% positividad a micobacterias	17 %	15 %	0,8471
% Tasa de Contaminación	5 %	8 %	0,5662

Leyenda: PM SS: Petroff modificado solución salina; NALC: N-Acetil-L-Cisteína

Existen escasos reportes a nivel mundial que comparen diferentes métodos de decontaminación, incluyendo el PM SS, en cuanto al tiempo promedio de detección de crecimiento de micobacterias en medio líquido.

El TDC obtenido en esta investigación es inferior a lo reportado por Martínez y cols en el año 2014, en Cuba que utilizó el PM SS como método pretratamiento para muestras no estériles y obtuvo un TDC promedio de 16,435 días promedio para el Bact Alert 3D, pero abarcó mayor número y varios tipos de muestras clínicas, incluyendo las extrapulmonares y no comparó con otros métodos de decontaminación (88). En cuanto al uso del NALC, los resultados son menores a los reportados por Amer y cols (86), que obtuvo para el Bact Alert 14,2 días.

En esta investigación el TDC promedio utilizando el PM SS y el NALC como métodos de decontaminación para el medio de cultivo líquido (Bact Alert 3D) fue de 10,7 y 12,2 días, respectivamente. Al comparar las varianzas no existieron diferencias

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

estadísticamente significativas ($p=0,3145$). Al tomar la prueba de comparación de medias en el supuesto de que las varianzas son iguales se concluyó que las media del TDC entre el cultivo en medio liquido donde se utilizaron los dos métodos de decontaminación no son significativamente distintas ($p=0,2864$).

Se calculó la proporción de verdaderos cultivos positivos a micobacterias para el PM SS y método del NALC en el cultivo en LJ y Bact Alert fue de 17,647 y 15,909 respectivamente, sin embargo al comparar no existieron diferencias significativas entre la proporción de cultivos positivos que fueron decontaminadas con PM SS en el medio de cultivo LJ versus cultivo liquido Bact Alert 3D ($p=0,9185$). Sin embargo es importante señalar que para el cultivo sólido como el líquido con el PM SS en el Bact Alert 3D se obtuvo mayor número de aislados en relación al NALC, que es el recomendado por la firma Biomeriux (13).

Las muestras clínicas procedentes de sitios no estériles deben someterse a procesos de digestión y decontaminación para una recuperación óptima de las micobacterias. La mayoría de las muestras clínicas enviadas al laboratorio de cultivo están contaminadas en mayor o menor grado por gérmenes de la flora normal que se reproducen a una gran velocidad y se desarrollarían rápidamente en la superficie del medio.

Los sistemas comerciales de cultivo, como el BacT ALERT 3D, utilizan antibióticos liofilizados reconstituidos para disminuir la contaminación bacteriana. Para este sistema, según la literatura internacional, debe utilizarse el sedimento de las muestras que han sido previamente decontaminadas por el método de NALC, sin embargo, algunos estudios han reportado tasas elevadas de contaminación bacteriana con este método (11) (76).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aunque no fue objetivo del estudio es importante señalar que un porcentaje de contaminación significativamente menor del 3% traduce un problema en el laboratorio, pues puede estar en relación con un tiempo prolongado de exposición de la muestra al agente decontaminante. Cuando ocurre esta situación, se pueden eliminar los bacilos que pudieran estar contenidos en la muestra, además de la flora normal del sistema respiratorio, aportando resultados falsos negativos del cultivo (76).

El método de decontaminación con NALC es el recomendado para muestras no estériles por las normas internacionales (8) (74). Fue sugerido por primera vez por Webb y cols en 1962 para el aislamiento y cultivo de micobacterias como agente decontaminante en muestras de esputo (89) y luego en 1963, Sheffner y cols demostraron su buen efecto mucolítico (90), sin embargo, durante ese mismo año, Kubica y cols demostraron, por primera vez, la utilidad de la combinación de estas dos características para el pretratamiento de las muestras clínicas no estériles para el cultivo (63) (64).

El NALC es quizás el método más comúnmente utilizado en la mayoría de los laboratorios de países desarrollados por su rapidez y relativa eficacia en reducir el número de contaminantes (79). Si se realiza adecuadamente la decontaminación, proporciona mayor positividad del cultivo que otros métodos, a diferencia de otras técnicas el resultado de la muerte de las micobacterias es aproximadamente del 30%.

No obstante tiene como desventaja que se pierde actividad del NALC rápidamente si se prepara la solución y se deja por varios días. Por otro lado, el tiempo de exposición debe ser vigilado estrictamente y algunos reactivos, tales como la albúmina bovina, y otros insumos como los filtros requeridos son muy caros y de difícil adquisición para

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

países de escasos recursos económicos (74). Además se necesita de la centrifugación, lo que conllevaría un costo adicional (78).

En la tabla 5 se muestran la comparación de los resultados de los indicadores de desempeño de los métodos de decontaminación del PM SS y NALC en el medio de cultivo sólido LJ y Bact Alert 3D. La sensibilidad del método de PM SS para ambos métodos de cultivo utilizado fue alrededor del 93%, superior al obtenido utilizando el NALC, método recomendado por las normas internacionales (74). El IY fue superior por el PM SS comparado con el NALC tanto para el LJ (0,91) como el cultivo líquido (0,89) para el sistema Bact Alert 3D.

Tabla 5. Comparación de los indicadores entre el método de Petroff modificado con solución salina y el NALC en el medio de cultivo LJ y Bact Alert 3D. LNRITBLM, IPK. 2012 – 2017.

Indicadores	Löwenstein Jensen		Bact ALERT 3D	
	PM SS	NALC	PM SS	NALC
Sensibilidad (%)	93,75	88,24	93,33	82,35
Especificidad (%)	97,10	98,53	95,89	98,59
Concordancia (%)	96,47	96,47	95,45	95,45
VPP (%)	93,75	88,24	82,35	93,33
VPN (%)	98,53	97,10	98,59	95,89
Indice de Youden	0,91	0,87	0,89	0,81

Leyenda: PM SS: Petroff modificado solución salina; NALC: N-Acetil-L-Cisteína; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

La sensibilidad del PM SS para el medio sólido obtenida en este estudio (93,75%) es similar a lo reportado por Ganoza y cols en Perú (77) en el 2008 (95,2%), país con una alta carga de TB, que analizó 106 muestras pulmonares de pacientes con sospecha

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

clínica de TB pulmonar y con rayos (x) sugestivos de la enfermedad, pero difieren (88,24%) de los resultados alcanzados por este autor en cuanto a la sensibilidad utilizando el NALC (76,2%). También fue superior a lo publicado por Amer y cols (86) en el 2016 que analizó 60 muestras pulmonares y obtuvo una sensibilidad de 71,9% con este método.

La sensibilidad para el sistema de cultivo líquido Bact Alert 3D con el NACL de en este estudio fue inferior (82,35%), a lo reportado por Amer y cols, que obtuvo un 100% (86). Esta diferencia pudiera estar dada a que este estudio se realizó en África, país de alta carga de TB, además fue realizado a 60 pacientes con clínica y radiografía altamente sugestivas de TB pulmonar, por lo que tuvieron una alta probabilidad de que los casos estudiados presentaran la enfermedad y la positividad del cultivo fuera elevada.

En Cuba se han realizado varios estudios donde se calcularon indicadores de desempeño del Bact Alert 3D, utilizando el PM SS como método de decontaminación. Los resultados de este trabajo son inferiores a los describió Martínez y cols (11) en el 2012 que obtuvo valores de sensibilidad (97,75 %), especificidad (98,44%) e índice de Youden (0,92) elevados y a lo reportado por la misma autora (91) en el 2015 (sensibilidad 99,1 %, especificidad 99,0 % e índice de youden 0,98). Sin embargo fueron similares a los reportados por Mederos y cols en el 2016, que incluyó 547 muestras pulmonares y extrapulmonares utilizando el mismo método de pretratamiento y obtuvo una sensibilidad, concordancia, e índice de youden de 90,91%; 94,48% y 0,89, respectivamente (92). Estos estudios tienen en común que incluyeron mayor número de muestras clínicas incluidas las extrapulmonares, y en esta investigación solo se incluyeron las pulmonares.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

- ✦ Los valores de desempeño del método de petroff modificado con solución salina fueron aceptables, lo que avala la continuidad de su uso como método de decontaminación de las muestras pulmonares en la red de laboratorios de tuberculosis de Cuba, además constituye un soporte para el Programa nacional de Control de la tuberculosis.

- ✦ Los resultados obtenidos avalan el método de decontaminación con petroff modificado con solución salina para el cultivo líquido mediante el sistema automatizado Bact Alert 3D, como alternativa en el pretratamiento de las muestras pulmonares de pacientes sintomáticos respiratorios.

RECOMENDACIONES

VIII. RECOMENDACIONES

- ✦ Informar los resultados de esta investigación a las autoridades del MINSAP, como evidencia de la aplicación del método de petroff modificado con solución salina, como método de decontaminación, lo que justifica y completa su recomendación para la red de laboratorios de Cuba.
- ✦ Sugerir el uso del método de petroff modificado con solución salina para la decontaminación de muestras pulmonares, en aquellas instituciones del Sistema Nacional de Salud que dispongan del sistema automatizado Bact Alert 3D y cumplan con los requerimientos de bio-contención para el trabajo con micobacterias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2014. Geneva, Switzerland. WHO/HTM/TB/2014.08.
2. Organización Panamericana de la Salud. Coinfección TB/VIH: Guía Clínica. Versión actualizada – 2010. Washington, D. C.: OPS. ISBN 978-92-75-33156-9. 2010.
3. Lozano Salazar JL, Plasencia Asorey C, Montanél DM, Puente Saníl. Coinfección por tuberculosis y virus de la inmunodeficiencia humana: confluencia de dos epidemias. MEDISAN 2012; 16(9):1438-50.
4. Global tuberculosis report 2017. World Health Organization 2017 Geneva. WHO/HTM/TB/2017.23.
5. Organización Panamericana de la Salud. Normas y Guía Técnica. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte I. Baciloscopía; 2008.
6. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el Diagnostico Bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guía Técnica. Parte II. Cultivo. 2008.
7. Essential components of a tuberculosis program: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. MMWR Recomm Rep 1995; 44(11):1-16.
8. Martínez Romero MR, Sardiña Aragón M, García León G, Mederos Cuervo L, Díaz Rodríguez R. Nuevas herramientas para el diagnóstico de la tuberculosis. Rev Cubana Med Trop 2015; 67(1):41-9.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A, Passerine Tosi, C., Nista, D., Bornigia, S., y col. Comparison of MB/BacT ALERT 3D system with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. J Clin Microbiol 2001; 39(2):651-7.
10. Solorzano A, Soria I, Roman J, Huertas P., Soto MJ, Piedrola G. and Gutierrez, J. Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples. J Microbiol Biotechnol 2009; 19:1259-64.
11. Martínez Romero MR, Sardiña Aragón M, García León G, Mederos Cuervo L, Vega Riverón B, Díaz Rodríguez R. Evaluación del sistema automatizado BacT ALERT 3D para el aislamiento de micobacterias en el LNRTB-IPK. Neumol Cir Torax 2012; 71(4): 333-8.
12. Inserto BacT/ALERT® MP 43-03064. Biomeriux.[Citado junio 2017]. Disponible en: <http://tbevidence.org/documents/rescentre/sop/BacTALERT%20MP.pdf>.
13. Customer Training Manual: Mycobacterial Testing With BacT/ALERT® Systems and Media. Global Customer Support K5 31JAN09.[Citado junio 2017]. Disponible en: <http://www.tbevidence.org/documents/rescentre/sop/BacTALERT%20TM.pdf>.
14. Resolución Ministerial No. 277. Ministerio de Salud Pública. Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Manual de Normas y Procedimientos. La Habana: Ed. Ciencias Médicas; 2013.
15. Teran R, Waard J. Recientes avances en el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio clínico. JIFCC 2015; 26(4):310-25.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

16. Raviglioni MC, O'Brien RJ. Tuberculosis. En: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, et al, editors . Harrison. Principios de Medicina Interna. 14a. ed. Madrid: Mc GrawHill-Interamericana; 1998.p.1149-61.
17. Stop TB. Partnership and World Health Organization. Towards a TB free future. 50 years: historical review of TB control. Geneva: WHO, 2002. (WHO/CDS/STB/2002.13).
18. Ledermann WD. La tuberculosis antes del descubrimiento de Koch. Rev Chil Infect 2003; (Edición aniversario): 46-7.
19. Maradona Hidalgo JA. Historia de la Enfermedades Infecciosas. Oviedo: Ediciones de la Universidad de Oviedo; Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012; 30(5):278–9.
20. Brown L. Clinical pulmonary tuberculosis. En: Brown, Martha Lewis Harris, Mrs. The story of clinical pulmonary tuberculosis. Baltimore: Williams & Wilkins; 1941. 382-91.
21. Ledermann WD. Franceses y alemanes tras la etiología de la tuberculosis. Rev Chil Infect 2003; (Edición aniversario): 20:43-5.
22. Koch R. La etiología de la tuberculosis y otros trabajos. Buenos Aires: Editorial Universitaria; 1965: 49-86.
23. Koch R. El desarrollo científico de la bacteriológica. Cid F. Breve historia de las ciencias médicas. 3ra ed. Barcelona; ESPAXS Publicaciones Médicas; 1990; 334-8.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

24. Ledermann WD. La tuberculosis después del descubrimiento de Koch. Rev Chil Infect 2003; (Edición aniversario); 48-50.
25. Daniel TM. The history of tuberculosis. Respir Med 2006; 100 (11): 1862-70.
26. Pérez Camacho I, Rivero Juárez, A, Kindelán JM, Rivero S. Present day treatment of tuberculosis and latent tuberculosis infection. Enferm Infecc Microbiol Clin 2011; 29 (1):41-6.
27. Bermejo MC, Clavera I, Michel de la Rosa FJ, Marín B. Epidemiología de la tuberculosis. An Sist Sanit Navar 2007; 30 (2):7-19.
28. WHO. Global strategy and targets for tuberculosis prevention care and control after 2015. EB134/12.2013. Disponible en: <https://www.google.com/search?q=Global+strategy+and+targets+for+tuberculosis+prevention+care+and+control+after+2015&ie=utf-8&oe=utf-8>.
29. Caminero Luna AJ. Epidemiología. En: Tuberculosis una perspectiva actual. JANO 2001; 60 (1380):40-7.
30. Plataforma Regional de América Latina y el Caribe. Situación epidemiológica de la tuberculosis en la región de las Américas. Acceso [19 abril 2017]. Disponible en: <http://plataformalac.org/2017/03/situacion-epidemiologica-de-tuberculosis-y-malaria-en-la-region-de-las-americas/>
31. OPS/ OMS. Situación de la tuberculosis en Las Américas, 2016. Acceso [18/04/2017]. Disponible en: http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=38626&lang=es.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

32. González Ochoa E, González Díaz A, Armas Pérez L, Llanes Cordero MJ, Marrero Figueroa A, Suárez Alvarez L et al. Tendencia de la incidencia de Tuberculosis en Cuba: lecciones aprendidas en 1991-1994 y su transcendencia en 2004-2012. Rev Cub Med Trop 2015; 67(1):122-38.
33. Ministerio de Salud Pública. Dirección de Registros Médicos y Estadística de Salud. La Habana, Cuba: Anuario Estadístico de Salud; 2017. ISSN: 1561-4433.
34. Micobacterias. En: Fraga JL, García Carbajal NL . Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. 25ª ed. México, DF: McGraw Hill Interamericana; 2011. 289-92.
35. Pfyffer GE, Brown Elliott BA, Wallace RJ. *Mycobacterium*: general characteristics, isolation and staining procedures. En: Murray PR, Baron JE, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editores. Manual of Clinical Microbiology: 8ª ed. Washington DC: ASM Press; 2003: 532-59.
36. Ramos de Rosario BB, Soto Cáceres V, Borrego MR. Validez del método concentrado en esputo con hipoclorito de sodio para el diagnóstico de BAAR en pacientes con radiografía anormal y Baciloscopia negativa. Rev Cuerpo Méd HNAAA 2012; 5(2):15-8.
37. Chandra TJ, Selvaraj R, Allam RR, Sharma YV. Same day sputum smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: modified ZN staining versus LED FM. J Curr Microbiol App Sci 2015; 4(4):75-81.
38. Martínez MR, Sardiña M, García G, Díaz M, Llanes MJ, Montoro EH. Evaluación del control de calidad de la baciloscopia en el diagnóstico de la tuberculosis en Cuba. Rev Cubana Med Trop 2006; 58(3):194-9.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

39. López Jácome LE, Hernández Durán M, Colín Castro CA, Ortega Peña S, Cerón González G, Franco Cendejas R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad* 2014; 3(1):10-8.
40. De Waar JH, Robledo J. Conventional Diagnostic Methods. En: Palomino JC, Cardoso Leao S, Ritacco V, editores. *Tuberculosis 2007. From Basic Science to patient care. First Edition. Antwerp, Belgium; 2007:401–19.*
41. WHO. Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis. WHO/HTM/TB/2011.8.
42. Ramsay A, Cuevas LE, Mundy CJF, Nathanson CM, Chirambo P, Dacombe R, et al. New Policies, New Technologies: Modelling the Potential for Improved Smear Microscopy Services in Malawi. *PLoS ONE* 2009;(4)11. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0007760>
43. Imaz M, Allassia S, Aranibar M, Gunia A, Poggi S, Togneri A, et al. Rendimiento de la microscopía de fluorescencia LED para la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes en muestras respiratorias en laboratorios periféricos de Argentina. *Biomédica* 2017; 37(2):164-74.
44. Hernández C, Gómez MJ. Técnicas bacteriológicas para el diagnóstico e identificación de *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta científica venezolana* 2001; 52(1):23–5.
45. Montoro Cardoso E, Díaz Rodríguez R, Lemus Molina D, Mederos Cuervo L, Valdés Hernández I, Martínez Romero MR, et al. El Laboratorio Nacional de Referencia y su contribución a la eliminación de la tuberculosis en Cuba. *Rev Cub Salud Pub* 2012; 38 (2): 214-29.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

46. Pérez del Molino ML, Tuñez Bastida V, García Ramos MR, Lado Lado FL. Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago. Santiago de Compostela. La Coruña: Med Integral 2002; 39(5):207-15.
47. Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ. *Mycobacterium*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al, editors. Manual of Clinical Microbiology, ed 7. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1999:399-437.
48. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? J Clin Micro 1993; 31(4):767-70.
49. Werngren J, Klintz L, Hoffner SE. Evaluation of a novel kit for use with the BacT/ALERT 3D System for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2006;44: 2130-2.
50. Marzouk M, Kahla IB, Hannachi N, Ferjeni A, Ben Salma W, Ghezal S, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates. Diag Microbiol Infect Dis 2011; 69(4):396-9.
51. Gaillarda T, Fabreb M, Martinauda C, Vongb R, Brisoua P, Solerb Ch. Assessment of the SD Bioline Ag MPT64 Rapid™ and the MGIT™ TBc identification tests for the diagnosis of tuberculosis. Diag Microbiol Infect Dis 2011; 70:154-6.
52. Arias MF, Herrera MT. Nuevos métodos para el diagnóstico de la tuberculosis. Rev Chil Enferm Respir 2016; 32(4): 254-9.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

53. Asencios L, Galarza M, Quispe N, Vásquez L, Leo E, Valencia E, et al. Prueba molecular Genotype R MTBDR plus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogorresistente. Rev Peru Med Exp Salud Pública 2012; 29 (1): 92-8.
54. Mitarai S, Kato S, Ogata H, Aono A, Chikamatsu K, Misuno K, et al. Comprehensive Multicenter Evaluation of a New Line Probe Assay Kit for Identification of *Mycobacterium* Species and Detection of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2012; 50: 884-90.
55. World Health Organization. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. Policy guidance. Geneva: 2016. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246131/1/9789241510561-eng.pdf?ua=1>.
56. Toro Rueda C, Amor Aramendía A. Diagnóstico molecular en tuberculosis: presente y futuro. Med Resp 2010; 3(3):53-60.
57. Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. MMWR 2000; 49: 593-4.
58. Barriga Angulo G, Solís Trejo M, Aceves Rosas A, López Álvarez L, Ramírez Cruz F, Monzalvo Hernández M E, et al. Evaluación de la prueba GeneXpert MTB/RIF en el diagnóstico rápido de la tuberculosis y de la resistencia a rifampicina en muestras extrapulmonares. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab 2014; 61(3): 140-4.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

59. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Data base Syst Rev* 2014; 21 ;(1):CD009593.
60. Dorman, SE, Schumacher, SG, Alland, D, Nabeta P, Armstrong DT, King B, et al. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance: a multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis* 2017.[citado 16 Marzo 2018] . Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30691-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30691-6).
61. Arend S M, Soolingen D V. Performance of Xpert MTB/RIF Ultra: a matter of dead or alive. *Lancet Infect Dis* 2018; 18(1):8-10.
62. Cernoch, P L; Enni, R K; Saubolle, M A; Wallace, R J; Weissfeld, AS (ed); *Laboratory Diagnosis of the Mycobacteriosis; Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology*. Washington D.C., American Society of Microbiology 1994, 8.
63. Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1963; 87: 775-9.
64. Kubica GP, Kaufmann AJ, Dye WE. Comments on the use of the new mucolytic agent, n-acetyl-l-cysteine, as a sputum digestant for the isolation of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1964; 89: 284-6.
65. Krasnow I, Wayne LG. Sputum digestion. The mortality rate of tubercle bacilli in various digestion systems. *Amr J Clin Path* 1966; (45): 284-88.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

66. Brochure TB Ag MPT64 Rapid. Is it TB or Non-TB?. [Citado junio 2017].
Disponible en:
http://www.standardia.com/es/home/product/rapid/infectiousdisease/TB_Ag_MPT64.html
67. World Health Organization. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. Policy update. WHO/HTM/TB/2013.16.
68. Moussa H, Bayoumi FS, Ali AM. Evaluation of Gene Xpert MTB/RIF assay for direct diagnosis of pulmonary tuberculosis. Saudi Med J 2016; 37 (10):1076-81.
69. De Paza DA, Potesa L, Quiñóneza E, Martínez LF, Cepedac M, Guarínd N, et al. Resistencia a fármacos antituberculosis en pacientes coinfectados con tuberculosis y virus de la inmunodeficiencia humana, en un hospital de referencia de 2007 a 2010 en Cali, Colombia. Infectio 2012; 16(3):161-5.
70. Por qué el VIH y la tuberculosis constituyen una combinación mortal?. Disponible en: <https://www.greenfacts.org/es/tuberculosis/l-2/4-vih-sida-tb.htm>.
71. Peralta Gómez I, Cabrera Rodríguez MC, Gutiérrez Díaz MJ. Coinfección TB/VIH: una amenaza para los programas de control de ambas enfermedades. Medicent Electrón 2015; 19(3): 160-2.
72. Martínez MR, Sardiñas M, García G, Mederos LM, Díaz R. Evaluation of BacT/ALERT 3D System for Mycobacteria Isolates. JTR 2014; 2:59-64.
73. Chaudhary SK, Mishra B. Comparison of hypertonic saline-sodium hydroxide method with modified Petroff's method for the decontamination and concentration of sputum samples. Int J Infect Microbiol 2013; 2 (3):78-81.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

74. Tripathi K, Tripathi PC, Nema S, Shrivastava AK, Dwiwedi K, Dhanvijay AK. Modified Petroff's Method: an Excellent Simplified Decontamination Technique in Comparison with Petroff's Method. *Int J Recent Trends in Science and Technol* 2014; 10(3):461-4.
75. Garay JE. Analysis of a simplified concentration sputum smear technique for pulmonary tuberculosis diagnosis in rural hospitals. *Tropical Doctor* 2000; 30: 70-2.
76. Martínez Romero MR, Díaz Almaguer M, Montoro Cardoso E. Comportamiento de los indicadores de calidad del cultivo en los laboratorios de diagnóstico de micobacterias en la provincia de Las Tunas, Cuba. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2009; 22 (4): 266-71.
77. Ganoza CA, Ricaldi JN, Chauca J, Rojas G, Munayco C, Agapito J, Palomino JC and Guerra H. Novel hypertonic saline–sodium hydroxide (HS–SH) method for decontamination and concentration of sputum samples for *Mycobacterium tuberculosis* microscopy and culture. *J Medic Microbiol* 2008; 57, 1094–98.
78. Zingué D, Hien H, Méda N, Zida S, Kaboré A, Sanou A. Advantages and drawbacks of expectoration decontamination methods for tuberculosis and anti-tuberculosis drug resistance diagnosis. *Ann Biol Clin* 2013; 71 (3): 283-91.
79. Yajko DM, Nassos PS, Sanders CA. Comparison of four decontamination methods for the recovery of *Mycobacterium avium* complex from stools. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 302-6.
80. World Health Organization. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis 2003. Geneva, Switzerland. WHO/HTM/TB2013.11.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

81. Chakravorty S, Dudeja M, Hanif M, Tyagi JS. Utility of universal sample processing methodology, combining smear microscopy, culture, and PCR, for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2703-8.
82. Cadmus SI, Falodun OI, Fagade OE. Methods of sputum decontamination with emphasis on local tuberculosis laboratories. *Afr J Med Med Sci.* 2011 Mar; 40 (1):5-14.
83. Garay JE. Analysis of a simplified concentration sputum smear technique for pulmonary tuberculosis diagnosis in rural hospitals. *Tropical Doctor* 2000; 30: 70-2.
84. Della LP. Mycobacteriology and mycobacterial susceptibility tests. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd edition. Henry D. Isenberg Editor in chief, A.S.M Press. 2004.
85. Ricaldi JN, Guerra H. A simple and improved method for diagnosis of tuberculosis using hypertonic saline and sodium hydroxide to concentrate and decontaminate sputum. *Tropical Doctor* 2008; 38: 97-9.
86. Amer S, Hefnawy AE, Mahmoud M, Okasha H, Gad M. Verification of Bact/Alert 3D System Results for Detection of *Mycobacterium* Tuberculosis. *Egyptian J Medic Microbiol* 2016; 25(4):105-11.
87. Sharma M, Misra RN, Gandham NR, Jadhav SV, Angadi K, Wilson V. Comparison of modified Petroff's and N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide methods for sputum decontamination
88. Martinez MR, Sardiñas M, Garcia G. Mederos LM, Díaz R. Evaluation of BacT/ALERT 3D System for Mycobacteria Isolates. *JTR* 2014; 2:59-64.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

89. Webb, WR. Clinical evaluation of a new mucolytic agent, acetylcysteine. J Thoracic Cardiovascular Surg 1962; 44: 330-43.
90. Sheffner AL. The reduction "in-vitro" in viscosity of mucoprotein solutions by a new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine. Ann NY Acad Sci 1963; 106: 289-97.
91. Martínez Romero MR, Sardiña Aragón M, García León G, Mederos Cuervo LM, Díaz Rodríguez R. Nuevas herramientas para el diagnóstico de la tuberculosis. Rev Cubana Medic Trop 2015;67(1):41-49
92. Mederos Cuervo LM, Martínez Romero MR, Sardiñas Aragón M, García León G, Concepción Acosta CM, Díaz Rodríguez R. Utilidad del cultivo rápido en medio líquido Bact/Alert 3D en el diagnóstico micobacteriano de muestras clínicas. AVFT 2016; 35 (3): 77-81.



ANEXOS

Anexo 1

➤ Preparación del medio de cultivo Löwenstein-Jensen (UIT).

- **Fundamento:** Se han desarrollado una gran variedad de medios para cultivar a las micobacterias. Éstos pueden dividirse en tres grupos principales: los medios preparados en base huevo, los medios de agar y los medios líquidos. El medio ideal para aislar a las micobacterias debe cumplir con los requisitos siguientes: a) ser barato y fácil de preparar utilizando ingredientes fácilmente accesibles; b) inhibir el crecimiento de contaminantes; c) favorecer un desarrollo abundante de una pequeña cantidad de bacilos; y d) permitir una diferenciación preliminar de las colonias aisladas sobre la base de su morfología. Para el cultivo de las muestras de esputo el medio más adecuado es el preparado en base de huevo ya que cumple con todos los requisitos señalados.

Reactivos

- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)
- Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)
- Citrato de magnesio
- Asparagina
- Glicerol
- Piruvato de sodio
- Agua destilada

Material

- Erlenmeyer de 500 ml y 1000 ml
- Probeta de 10 y 1000 ml
- Irrigador de 500 ml y 1000 ml
- Tubos de 20x150 mm con tapa de rosca
- Gradilla
- Reloj contador
- Gasa y papel
- Horno de tiro de aire forzado
- Incubadora

Procedimiento

1. Pesar las siguientes sales:

KH ₂ PO ₄	2,4 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O.....	0,24 g
Citrato de magnesio.....	0,6 g
Asparagina.....	3,6 g

2. Adicionar las sales a los 600mL de agua destilada.
3. Aplicar calor y agitar alternadamente hasta evidenciar una disolución total.
4. Adicionar 12 ml de Glicerol y agitar por varios segundos.
5. Adicionar 0,4 g de verde malaquita y agitar por varios segundos.
6. Mezclar la solución con 1000 ml de huevos frescos homogenizados. Agitar y dejar reposar durante 5 minutos.
7. Distribuir con el irrigador 6,5 ml del medio en tubos 20 x 150 mm.
8. Colocar los tubos con las tapas flojas y dispuestos en plano inclinado dentro del horno en frío.
9. Permitir que el horno alcance una temperatura de 82oC por una hora (programado el equipo).
10. Dejar que enfríe lentamente dentro del horno, para evitar la formación de agua de condensación.

Anexo2. Decontaminación de las muestras por el método del N-Acetil-L-Cisteína.

Reactivos:

- Reactivo R1: L-cisteína Clorhidrato _____ 5g
- Reactivo R2: Cloruro de benzalconio _____ 20 x 10 mL
- Reactivo R3: Tampón fosfato pH 6.8 _____ 20 x 15 mL
- Reactivo R4: Albúmina humana al 0.2% _____ 16 x 10 mL

Preparación de los reactivos:

- Dejar que alcance la temperatura ambiente.
- Disolver 50 mg de R1 en 10 mL de R2 (este reactivo descontaminante debe ser preparado en el momento).

Anexo 3. Procedimiento para realizar la tira SD BIOLINE

Permite la distinción rápida entre el complejo *M. tuberculosis* y MNT, la identificación del complejo *M. tuberculosis* en combinación con sistemas de cultivo y el resultado de la prueba: 15 minutos (66).

Preparación del inóculo: Si es a partir del medio líquido: se tomarán 100 µL de la botella MP y se transferirá a la tira. Si es partir del medio sólido: se realizará una suspensión bacteriana con una asada de 3 a 4 colonias del medio sólido, positivo a BAAR y resuspenderá en 200 µL del buffer o agua destilada estéril y/o también puede utilizarse 100 µL del fluido de condensación de los tubos y aplicarlo directamente.



Nota: La intensidad del color de la banda depende de la concentración del Ag MPT64 en el medio de cultivo.

Anexo 4. FLUJOGRAMA DE TRABAJO

