

DIAGNOSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

INFORMACIÓN DE APLICACIÓN CLÍNICA

Dr. Carlos A. Javier Zepeda

Sí la importancia de una enfermedad para la humanidad se mide por el número de muertes que causa, la tuberculosis debe considerarse mucho más importante que las enfermedades infecciosas más temidas.

R. Koch, 1882

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La tuberculosis es una enfermedad sistémica cuya manifestación clínica más frecuente es el compromiso de los pulmones. La naturaleza generalizada de la enfermedad fue reconocida por Laennec, quien en 1819 propuso la unidad del proceso patológico; más tarde y también en Francia, Villemín en 1865 demostró la transmisibilidad de la infección de humanos a animales y en 1882 Koch en Alemania, demostró por examen directo y cultivo el bacilo de la tuberculosis y estableció la naturaleza específica de la enfermedad al transmitirla a partir de cultivos puros del bacilo a animales experimentales (1), lo que constituyó la base de sus famosos postulados.(2)

Koch, en sus estudios clásicos que culminaron con la presentación de su descubrimiento en 1882, utilizó una coloración a base de azul de metileno alcalinizado con hidróxido de Potasio, estableciendo en esta forma la necesidad de un pH alcalino para favorecer la penetración del colorante a la célula del bacilo de la tuberculosis. Esta coloración tardaba 24 horas a temperatura ambiente pero su tiempo podía acortarse por la aplicación de calor. En su método original usó vesuvina como contra-colorante, los bacilos aparecían de color azul y las bacterias comunes, células humanas y animales de color café. En la publicación original de su descubrimiento (3), Koch escribió: "Las bacteriasvisua-

lizadas por esta técnica muestran muchas características distintivas, tienen forma de bastón y por lo tanto pertenecen al grupo de los bacilos. Son muy delgados y solo tienen de un cuarto a la mitad del diámetro de un glóbulo rojo pero a veces pueden alcanzar un tamaño igual al diámetro de un glóbulo rojo. Tienen una forma y tamaño que es sorprendentemente parecido al bacilo de la lepra"* y continuó describiendo: ". . . en todas las localizaciones donde el proceso tuberculoso se ha desarrollado recientemente y está progresando rápidamente, estos bacilos se encuentran en gran número. Ordinariamente forman pequeños grupos de células que están dispuestos en haces y apretados unos con otros y a menudo están dentro de las células tisulares. Muchas veces las bacterias se encuentran en gran número fuera de las células también, especialmente en la periferia de las masas caseosas grandes. Tan pronto como el proceso de la erupción tubercular ha pasado, los bacilos se vuelven escasos, pero aún se encuentran en pequeños grupos y aislados. Finalmente pueden desaparecer por completo, pero esta desaparición completa raramente se ve."

Koch cultivó el bacilo de la tuberculosis en un medio de suero estéril de bovinos u ovinos solidificado por exposición al calor, incubando la siembra a 37-38°C durante varias semanas. El obtuvo crecimiento generalmente en la segunda semana.

Cuando Koch hizo su presentación ante la Sociedad Fisiológica de Berlín, se encontraba en la au-

Servicio de Microbiología Clínica, Departamento de Laboratorios Clínicos, Hospital Escuela, Tegucigalpa.

* Hansen había descrito el bacilo de la lepra en 1874.

diencia un joven médico de 28 años, Paul Ehrlich, que desde hacía varios años venía trabajando con colorantes de anilina en sus estudios sobre la morfología de las células sanguíneas, incluso había introducido el uso del azul de metileno, que fue el colorante que Koch había utilizado en sus estudios. Habiendo escuchado la exposición de Koch, Ehrlich salió directamente hacia su laboratorio a trabajar en un método que permitiera una coloración más rápida de las preparaciones, tomando en cuenta que era necesario utilizar una coloración alcalina. Ehrlich tuvo un éxito casi inmediato; en lugar de usar azul de metileno, utilizó como colorantes fuchsina o violeta de genciana y en lugar de hidróxido de Potasio, usó anilina. Con este método, el bacilo se coloreaba intensamente y además presentaba una nueva característica, era ácido resistente, pues no se decoloraba aun usando ácido nítrico al 30o/o. (4)

Aunque el mérito de haber descubierto la propiedad de ácido resistencia del bacilo de la tuberculosis pertenece a Ehrlich, su método fue posteriormente modificado por varios investigadores, entre ellos Ziehl, que usó fenol o resorcina en lugar de anilina y Neelsen que usó ácido sulfúrico en lugar de ácido nítrico; la técnica de coloración adquirió entonces el nombre de estos autores y se sigue utilizando extensamente en muchas partes del mundo.

Después de esos trabajos iniciales, muchos investigadores aportaron métodos y técnicas para el estudio del bacilo de Koch que actualmente se usan en los laboratorios de micobacteriología.

DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS.

El diagnóstico de la tuberculosis es un proceso analítico clínico que requiere, por parte del médico, de un conocimiento a fondo de la patogénesis, patología y manifestaciones clínicas de la infección tuberculosa así como de la epidemiología de la enfermedad. Este proceso clínico puede ser auxiliado por métodos accesorios muy importantes como son los estudios radiológicos, la reacción a la tuberculina y los métodos bacteriológicos.

El diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis depende del aislamiento y la identificación del bacilo de la tuberculosis a partir de muestras clínicas del paciente. *Aunque la observación directa de bacilos ácido resistentes en dichas muestras es muy importante, su presencia sólo debe conside-*

rarse evidencia presuntiva sujeta a comprobación por cultivo) ya que un informe de laboratorio que sugiera una infección tuberculosa puede tener serias consecuencias y afectar la vida del paciente por meses o años.

Todo procedimiento para la manipulación de muestras para el estudio del baño de la tuberculosis debe efectuarse en un gabinete de protección bacteriológica. De no cumplirse esta recomendación, se expone al personal de laboratorio a contaminaciones y contagio con el bacilo. Algunos laboratorios exigen además el uso de mascarillas al personal que maneja estas muestras.

Tomando en cuenta la importancia que reviste esta actividad, es necesario que existan buenos laboratorios de micobacteriología, donde el personal técnico y profesional tenga un excelente nivel de capacitación. Debido a que tanto el volumen de trabajo como la complejidad de los métodos hacen necesaria la estratificación de estos servicios, se ha propuesto (5) que existan diferentes niveles de laboratorios para llevar a cabo el trabajo. La Sociedad Americana del Tórax ha recomendado los siguientes, cuyas funciones son:

- NIVEL 1. a) Colectar muestras clínicas adecuadas
 b) Transportar muestras a laboratorios de nivel II
 c) Preparar y examinar láminas para el diagnóstico presuntivo o como medio para controlar el progreso de pacientes que están recibiendo terapia antituberculosa.
- NIVEL II. a) Lleva a cabo las funciones del nivel I
 b) Procesa muestras para cultivo
 c) Identifica *Mycobacterium tuberculosis*
 d) Puede efectuar estudios de susceptibilidad a drogas antituberculosas.
 e) Retiene muestras para estudios adicionales.
- NIVEL III a) Lleva a cabo las funciones de los niveles I y II
 b) Identifica micobacterias de otras especies
 c) Debe llevar a cabo estudios de susceptibilidad a drogas antituberculosas
 d) Puede llevar a cabo programas de investigación y dar adiestramiento para personal de laboratorio

- e) Participa o lleva a cabo programas de control de calidad para otros laboratorios.

Antes de discutir en forma específica el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis revisaremos en forma general algunos aspectos del género *Mycobacterium*.

LAS MICOBACTERIAS

Las micobacterias (género *Mycobacterium*) son bacilos inmóviles, aeróbicos, que no forman esporas. Son resistentes a la decoloración con ácido y alcohol. Su contenido lípido es alto, crecen con lentitud en muchos de los casos. Las especies de crecimiento más rápido requieren de dos a tres días en medios simples pero la mayoría requieren de dos a seis semanas en medios complejos y a temperaturas muy específicas. Las colonias pueden ser ásperas, como sucede en la tuberculosis, pero otras especies pueden tener colonias lisas o de textura intermedia. Las diferentes especies del género tienen o no, la propiedad de formar pigmentos en presencia o ausencia de luz. *M. leprae*, una de las especies patógenas del género, no puede cultivarse todavía en medios artificiales in vitro, aunque se ha demostrado su reproducción en células de Schwann de ratón cultivadas in vitro.

Las micobacterias se pueden encontrar en el agua, en el suelo, en los alimentos y en varias especies de animales. *M. tuberculosis* sólo se encuentra en los humanos como infección natural, aunque puede experimentalmente ser transmitida a otros mamíferos.

Se han descrito unas 19 diferentes especies del género *Mycobacterium* que pueden causar enfermedad en el humano, a esas enfermedades se les llama micobacteriosis y se les designa con el nombre de la especie demostrada, por ejemplo, micobacteriosis chelonei en el caso de una infección por *M. chelonei*. La enfermedad que llamamos tuberculosis sólo es causada por dos especies del género: *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Estas dos especies, así como *M. leprae* y *M. marinum* se consideran patógenos estrictos del humano, es decir que cuando se encuentran en los tejidos humanos siempre están causando daño.

Hay otras especies de micobacterias que tienen potencial patogénico pero que también pueden tener una existencia saprofítica, de tal forma que su presencia en muestras clínicas no es siempre

evidencia de enfermedad. Finalmente, hay micobacterias que sólo tienen vida saprofítica y nunca se ha demostrado que produzcan enfermedad, al menos en humanos. Debido a lo anterior, en lo que se refiere al diagnóstico de la tuberculosis siempre es necesario cultivar el bacilo e identificarlo específicamente, ya que en muestras clínicas pueden encontrarse otros bacilos ácido-alcohol resistentes que no son bacilos de la tuberculosis. En presencia de una historia clínica, un examen físico y un análisis epidemiológico que sugieran fuertemente la posibilidad de una infección tuberculosa, la demostración de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) es una evidencia presuntiva de la infección pero no una demostración definitiva.

A las micobacterias que son especies distintas de los patógenos estrictos se les llamaba anteriormente micobacterias atípicas, este término ha sido abandonado. Antes se usaba para designar aquellas especies cuyas características bacteriológicas no eran típicas del bacilo de la tuberculosis. Hoy en día debe usarse el término *Mycobacterium* sp. ("species"), o su nombre específico si ha sido identificado. En conjunto se habla de estos organismos como micobacterias no tuberculosis. La importancia médica de este grupo de bacterias ya había sido reconocida desde los años 50, Runyon en 1959 propuso una clasificación de las mismas en base a sus características de crecimiento y foto cromogenicidad, que para fines de identificación en el laboratorio continúa siendo útil.

Con excepción de *M. tuberculosis*, *M. Bovis*, *M. aviumintracellulare*, y *M. leprae*, las otras micobacterias no se consideran contagiosas.

M. tuberculosis y *M. bovis* son bacilos ligeramente curvos, de 2 a 4 μ de longitud y 0.2 a 0.5 μ de diámetro, que se colorean en su totalidad o en forma segmentaria (granular), pueden encontrarse separados o en grupos. Pueden crecer en medios sólidos y líquidos, sus requerimientos nutricionales son simples y crecen mejor a un pH entre 6.5 y 6.8. El glicerol es una mejor fuente de Carbono que la glucosa y su crecimiento in vitro aumentan en forma importante si se usa una atmósfera de incubación con 5 a 10% de CO₂. El bacilo de la tuberculosis es susceptible al calor y es eliminado con la temperatura de pasteurización (63°C durante 30 minutos) Cuando se encuentra en esputo seco, puede mantenerse vivo hasta dos meses si no se expone a la luz solar directa. La exposición a la luz solar

durante 20 a 30 horas mata al bacilo. Cuando se encuentra en gotas microscópicas de saliva flotando **en el aire**, el bacilo puede mantenerse infeccioso hasta 10 días. El bacilo es relativamente resistente a los ácidos, álcalis, sales de amonio cuaternario y otros desinfectantes comunes, sin embargo, es fácilmente inactivado por exposición a fenol 5o/o (aunque en el esputo puede tomar hasta 24 horas el efecto) o solución de hipoclorito de Sodio 5o/o.

DIAGNOSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

La contribución del laboratorio bacteriológico al diagnóstico de la tuberculosis puede convenientemente ser considerada en cuatro fases:

1. Asegurar la obtención de muestras adecuadas para estudio
2. Detección del bacilo por examen microscópico directo
3. Aislamiento en cultivo e identificación del bacilo
4. Determinación de la susceptibilidad del bacilo a las drogas antituberculosas.

COLECCIÓN DE MUESTRAS:

La obtención de una buena muestra clínica es el primer paso para efectuar un buen examen de laboratorio. El mayor problema aislado, en la recuperación del bacilo de la tuberculosis en muestras clínicas, es la presencia de organismos contaminantes. Por esta razón se recomienda que las muestras sean obtenidas y procesadas prontamente. Si se anticipa un atraso, las muestras deben refrigerarse.

Los recipientes en los que se recoge la muestra deben manipularse con cuidado para evitar la contaminación de la superficie externa, se ha demostrado que esto es un riesgo para el personal de hospital y de laboratorio (6)

ESPUTO: Para evitar en lo posible, la interferencia de secreciones contaminantes como saliva y secreción nasofaríngea, se recomienda que el paciente haga un cuidadoso aseo de la boca y de la faringe antes de obtener la muestra. Antes se recomendaba la obtención de muestras de esputo de 24 horas, actualmente esta práctica se ha descontinuado porque no hay mayor recuperación de bacilos y más bien aumenta el grado de contaminación y retarda el crecimiento de los bacilos en los cultivos. La re-

comendación actual es la obtención de muestras de esputo temprano por la mañana, aproximadamente de 5 a 10 ml en frascos bien limpios, una muestra diaria durante tres días sucesivos. Si se quiere ser más exhaustivo se pueden obtener hasta cinco muestras. Mas allá de este número no aumenta el índice de recuperación (fig. 1). La obtención

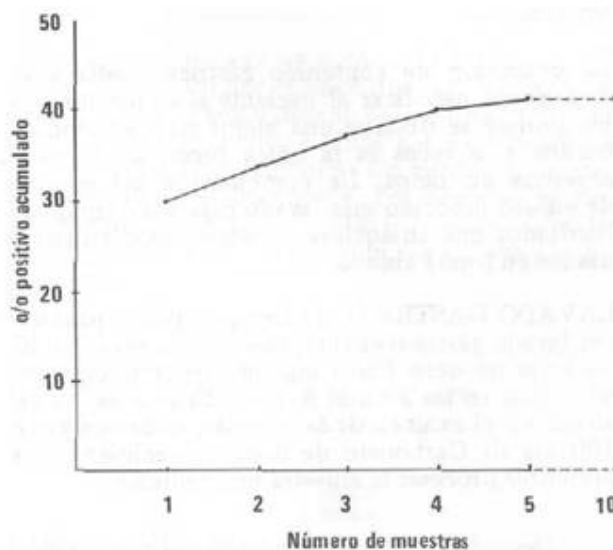


Fig. 1

Relación entre el número de muestras de esputo obtenidas y los cultivos positivos en pacientes con sospecha de tuberculosis (App. Microbiol. 1969, 18:915).

de una buena muestra depende de una buena expectoración y el paciente debe forzar un acceso de tos para obtener el material de secreción bronquial. En los pacientes que no tienen expectoral y sobre todo en niños, es difícil y a veces imposible obtener muestras por expectoración espontánea. En esos pacientes se pueden usar varias alternativas: 1) inducir la producción de esputo con solución salina tibia al 10o/o mediante el uso de nebulizador. Cuando se usan nebulizadores deben usarse soluciones de por esta sustancia es inhibitoria para las mico bacterias. La obtención de esputo inducido es superior a resultados obtenidos por lavado gástrico y el procedimiento es menos molesto para los pacientes (7) En el laboratorio, la calidad de las muestras debe evaluarse de acuerdo con los criterios Murray y Washington (8), de no hacerlo, se c

promete seriamente la validez clínica de los resultados.

Es esencia estos criterios establecen que si en un extendido de esputo examinado con una magnificación de 100X (lente 10X y ocular 10X) se encuentran más de 25 células epiteliales escamosas por campo, la muestra no es representativa y debe repetirse.

La obtención de contenido gástrico media hora después de nebulizar al paciente sí es recomendable porque se obtiene una mejor recuperación de bacilos y a veces es la única forma de obtener muestras en niños. La combinación del estudio de esputo inducido más lavado gástrico da mejores resultados que cualquiera de estos procedimientos usados en forma aislada.

LAVADO GÁSTRICO: El tiempo óptimo para hacer lavado gástrico es temprano por la mañana. El paciente no debe haber ingerido medicamentos ni alimentos en las últimas 8 horas. Si se anticipa un atraso en el examen de la muestra, debe agregarse 100 mg. de Carbonato de Sodio al recipiente. Es preferible procesar la muestra prontamente.

Después de hacer la aspiración del contenido gástrico y colocarlo en un recipiente estéril, se introduce por la sonda un volumen de 20 a 30 ml de agua destilada y se vuelve a aspirar. Este material de lavado gástrico se agrega al aspirado original y se envía prontamente al laboratorio donde debe ser neutralizado con NaOH.

MEDULA OSEA: La siembra de material aspirado de la médula ósea es un procedimiento cuya validez no es suficientemente apreciada. Es un método muy efectivo para la demostración de tuberculosis diseminadas, particularmente en niños. (9) Se recomienda sembrar los tubos al momento de obtener la muestra; si no es posible, el material aspirado debe enviarse al laboratorio con prontitud y preferentemente debe usarse un anticoagulante.

TEJIDOS: Deben obtenerse con procedimientos asépticos y enviarlos al laboratorio en un frasco estéril. Se recomienda poner en el frasco una gasa humedecida con solución salina estéril para evitar que se seque el tejido.

Las formas ganglionares de tuberculosis a veces representan un problema de diagnóstico. En los

pacientes con adenopatías linfáticas cerradas palpables, es decir cuando no hay fistulización hacia la piel, se pueden hacer punciones con aguja (10,11) para aspirar material del ganglio y procesarlo para examen directo y cultivo. Si el ganglio se extrae quirúrgicamente, la mitad se fijará en formalina para estudio histopatológico y la otra mitad se envía al laboratorio de Bacteriología en un frasco estéril, en una gasa humedecida con suero salino. Si se anticipa un atraso, debe refrigerarse.

Cuando ya hay un drenaje al exterior, la muestra de material caso purulento debe ser obtenida del interior de la lesión después de hacer una cuidadosa asepsia externa. Debe tenerse en cuenta que las fistulas muchas veces están colonizadas por organismos de la piel y eso puede interferir con el cultivo. Por eso, si es posible, la muestra debe sembrarse en duplicado, una parte en forma directa y la otra después de someterla a descontaminación.

SANGRE PERIFÉRICA: Estas muestras tienen un valor muy limitado para el diagnóstico de la tuberculosis y su estudio bacteriológico debe evitarse para este propósito.

HECES: La validez del examen microscópico de las heces para BAAR es nula porque en el intestino con frecuencia hay bacterias ácido resistentes de especies saprofitas. Sin embargo, si se vuelve necesario procesar muestras de heces para cultivo por micobacterias, se recomienda tomar un hisopado de material fecal, emulsificarlo en un caldo de albúmina de Dubos, incubarlo durante 18 a 24 horas y después tratar este caldo como si fuera esputo.

LINFA: Las muestras de linfa obtenidas por canalización del conducto torácico han sido utilizadas para estudio de pacientes con sospecha de tuberculosis abdominal. (22)

Los exudados purulentos de abscesos "fríos", es decir que no se acompañan de intensa reacción inflamatoria aguda son frecuentemente de origen tuberculoso y siempre deben ser estudiadas por micobacterias.

DETECCIÓN DEL BACILO POR EXAMEN DIRECTO DE LAS MUESTRAS:

Todas las muestras enviadas al laboratorio para estudio por micobacterias deben ser sometidas

a estudio bacteriológico directo. La característica de ácido-resistencia hace que el examen directo sea muy importante. Aunque el significado de la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes solo es presuntivo, si se acompaña de datos clínicos y epidemiológicos sugestivos de la enfermedad, permite tomar decisiones tempranas, ya que generalmente el resultado del cultivo tardará varias semanas más. El examen microscópico ayuda además con la evaluación del crecimiento de colonias en los cultivos.

Las muestras clínicas se pueden estudiar tal como llegan al laboratorio o después de someterlas a procedimientos de concentración para incrementar la tasa de positividad. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que el examen directo es una técnica insensitiva cuando la comparamos con el cultivo y como la excreción del bacilo (en muestras de esputo) es irregular, también lo son los resultados obtenidos.

Es posible que haya exámenes directos positivos acompañados de cultivo negativo, eso a veces se debe al uso de procedimientos fuertes de descontaminación de las muestras o al uso de drogas antituberculosas antes de obtener la muestra.

Las consideraciones anteriores asumen una técnica aceptable, pero si por otro lado no tenemos un manejo debido de las muestras, la recuperación de bacilos estará más comprometida. Entre las causas técnicas de error se incluyen:

1. láminas mal preparadas
2. confusión del bacilo con artefactos de la preparación
3. decoloración excesiva
4. poco contraste del contracolorante
5. soluciones de colorante mal preparadas
6. contaminación de la preparación con bacilos del agua
7. uso de recipientes de coloración para varias láminas.

Las muestras siempre se examinan con lente de inmersión, eso significa una magnificación entre 800 y 1250 veces, por lo general 1000 veces. De acuerdo con los Standards para el Diagnóstico y Clasificación de la Tuberculosis y otras Enfermedades por Micobacterias (12), se debe utilizar la siguiente escala de informes.

Número de bacilos observados	Método de informe
0 en 100 o más campos 1 a 2 en 300 campos	Negativo por BAAR (—) Se informa el número de bacilos observados y se pide repetir la muestra (±)
1 a 9 en 100 campos 1 a 9 en 10 campos 1 a 9 en cada campo 10 o más por campo	Número promedio/100 campos (1+) Número promedio/10 campos (2+) Número promedio/campo (3») Más de 9 por campo (4*)

Teóricamente no hay un número de bacilos que no se pueda detectar por examen directo, pero estadísticamente, el examen directo es una prueba de probabilidad, entre menos bacilos hay en la muestra, menos probable es encontrar un resultado positivo en el examen microscópico. Por ejemplo, se han calculado estas probabilidades y para cada uno de los grupos de la tabla anterior, los valores son los siguientes:

Si en el examen directo el número de bacilos es...	La probabilidad de que haya un informe positivo del examen microscópico es:
0 en 100 o más campos	menos del 10o/o
1 a 2 / 300 campos	50o/o
1 a 9 / 100 campos	90o/o
1 a 9 / 10 campos	96.2o/o
1 a 9 / campo y 10 o más por campo	99.5% mayor

De acuerdo con el Centro de Control de Enfermedades (CDC) del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de América, el tiempo promedio para examinar 300 campos microscópicos de inmersión en una lámina, para buscar bacilos ácido-resistentes, es de 25 minutos. Si consideramos que el área de cada campo microscópico es de 0.02 mm² y que el área total de la preparación es usualmente de unos 2 cm², para examinar toda la preparación se tendrían que ver 10,000 campos microscópicos. Se ha calculado que si solo se examinan unos 100 campos microscópicos, para detectar un bacilo es necesario que en la preparación haya 800, esto corresponde a que 1 ml de esputo debe tener unos 270.000 bacilos.

Lo anterior demuestra que es necesario tener la paciencia y la conciencia adecuadas al caso, para examinar una muestra por bacilos ácido-resistentes. También teóricamente significa que una sola persona, asumiendo que hace un trabajo ininterrumpido en el microscopio, sólo podría examinar exhaustivamente entre 16 y 20 muestras diarias.

Para los médicos en áreas rurales, Centros de Salud y hospitales pequeños o mal abastecidos de perso-

nal o facilidades adecuadas de laboratorio, el examen microscópico continúa siendo el procedimiento más valioso para el diagnóstico de la tuberculosis. La negatividad del examen, como ya se dijo, no excluye la posibilidad de infección o enfermedad tuberculosa pero la sensibilidad clínica del método puede mejorarse si la muestra se concentra por centrifugación o por filtración (13)

La técnica de coloración que se recomienda de rutina para el examen directo es el método de Ziehl-Neelsen. Hay otras técnicas que también dan buenos resultados, como el método de Kinyoun, que usa los mismos colorantes que el primero, pero no requiere calentamiento de la muestra; y el método de Truant que en lugar de Fuchsin, utiliza sustancias fluorescentes (auramina y rodamina) para colorear el bacilo. Esta última es una simple técnica de coloración que se basa en el mismo principio que la coloración de Ziehl-Neelsen, pero requiere del uso de un microscopio de luz ultravioleta equipado con los filtros especiales para detectar la fluorescencia de la auramina. No debe considerarse una técnica de inmunofluorescencia.

Comparativamente, la sensibilidad de todos estos métodos es igual, pero la técnica de Truant quizás permita el estudio más rápido de las preparaciones y por eso podría recomendarse para el tamizado de numerosas láminas el mismo día.

CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL BACILO DE LA TUBERCULOSIS

Como ya se dijo, la mayor parte de las muestras enviadas para cultivo para micobacterias, contienen otros microorganismos que al crecer podrían impedir el crecimiento del bacilo de Koch, que crece más lentamente. Por esta razón, el aislamiento del bacilo a menudo depende del uso de métodos de descontaminación de las muestras. Las muestras obtenidas de sitios normalmente estériles como líquido cefalorraquídeo, líquido articular, médula ósea, etc., no se someten a procedimientos de descontaminación.

El alto contenido lipídico de la célula del bacilo de la tuberculosis hace que éste sea muy resistente al tratamiento con diversos agentes químicos que fácilmente dañan a otras bacterias comunes. Sin embargo, aun usando los métodos menos drásticos,

solo un 10 a 20% de las micobacterias van a sobrevivir a dicho tratamiento. En el laboratorio se trata de usar los métodos más suaves y por eso, siempre existe el riesgo de que las muestras no sean completamente descontaminadas y el cultivo resulte contaminado con crecimiento de bacterias comunes. Esa tasa de contaminación en el laboratorio no debe superar un 5% del total de cultivos y debe mantenerse entre 2 y 5%. Si es menor del 2% más bien es indicativo de que se están usando métodos muy fuertes de descontaminación.

Junto con el procedimiento de descontaminación, en algunas muestras es necesario usar sustancias con propiedades mucolíticas como acetilcisteína, ditioneitol, fosfato trisódico y algunas enzimas para el tratamiento de muestras con moco espeso, ej. esputo. Eso facilita la acción del agente descontaminante y su uso en concentraciones más bajas, además, licúa la muestra y la hace más manejable. La rapidez con que actúan los distintos agentes descontaminantes es variable (14)

La tabla siguiente indica los agentes descontaminantes más usados:

1. Hidróxido de Sodio 4%
2. Hidróxido de Sodio 2% + N—Acetilcisteína (odithiotreitol)
3. Fosfato trisódico 13% + Cloruro de Benzalkonio (Zephiran[^])
4. Clorhidrato de Cetilpyridium 1% + NaCl 2%
5. Acido Sulfúrico 4%
6. Acido Oxálico 5%

Las muestras descontaminadas, licuadas u homogenizadas, son luego sometidas a concentración. Esto puede hacerse por centrifugación siempre y cuando se tome en cuenta que la densidad del bacilo sea suficientemente mayor que la del medio de suspensión. Esto a veces se logra agregando una solución isotónica tamponada a la muestra después de que se ha descontaminado (ej. Buffer de fosfato 0.067M pH 6.8). La fuerza centrífuga debe ser al menos 3000 G y el tiempo de centrifugación de unos 30 min. Se ha demostrado que el incremento de la fuerza centrífuga aumenta tanto el número de exámenes directos y cultivos positivos como la correlación entre los resultados del examen directo y los cultivos (15). Para algunos líquidos, en parti-

cular líquido cefalorraquídeo, el método de concentración por filtración se puede usar en forma más conveniente (16).

El cultivo de la muestra debidamente tratada es sumamente importante, los pacientes con cambios radiográficos mínimos de enfermedad pulmonar tienen más probabilidades de tener un cultivo positivo con examen directo negativo que los pacientes con tuberculosis bien establecida con formación de cavernas. (17)

Para el cultivo se utilizan varios medios que permiten el crecimiento de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y otras mico bacterias. Entre ellos hay medios selectivos y no-selectivos, con base de huevo y con base de agar. Se recomienda que en la siembra primaria se utilicen: un medio no-selectivo a base de huevo (ej. Loewenstein-Jensen, ATS o Petroganani), un medio no selectivo a base de agar (ej. Middlebrook 7H10 o preferentemente Middlebrook 7H11) y por lo menos un medio selectivo, ya sea a base de huevo (ej. Gruft o Mycobactosel) o a base de agar (ej. Middlebrook 7H10 selectivo o Middlebrook 7H11 selectivo, llamado también medio de Mitchison). Además de las fórmulas antes mencionadas, hay otros medios de cultivo que han sido usados con éxito para el cultivo de micobacterias. A todos los medios, y bajo indicaciones particulares, se les puede agregar suplementos nutritivos adicionales.

La incubación de los cultivos en una atmósfera de 5 a 10% de CO₂ es esencial para el crecimiento de micobacterias en los medios a base de agar y es estimulante para el crecimiento del bacilo en los medios a base de huevo. El estímulo máximo se produce entre el 4o y 10o día de incubación.

Los cultivos una vez sembrados en los medios apropiados e incubados en la atmósfera adecuada, se mantienen a 37°C entre seis y diez semanas. Los platos de Petri y los tubos son examinados diariamente. Si no hay crecimiento al cabo de este tiempo, se descartan. Si por otro lado, si se demuestra crecimiento, se procede a la identificación del organismo sospechoso.

Típicamente, *M. tuberculosis* y *M. bovis* son organismos de crecimiento lento a 37°C, la colonia es áspera y no tiene pigmento. En los medios a base

de agar se puede detectar crecimiento desde los 10 días, en los medios a base de huevo generalmente crecen después de las dos semanas.

La discusión de los métodos de identificación del bacilo no cabe dentro de este resumen, los procedimientos utilizados se basan en la demostración de propiedades morfológicas, metabólicas, fotocromógenas, cromatográficas, etc. (18,19,20),

SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS.

Debido a la creciente importancia de la necesidad de conocer la resistencia primaria a las drogas anti-tuberculosas (definida como la resistencia de la mico bacteria) aislada en un paciente que NO ha sido tratado anteriormente), a menudo es necesario efectuar estudios de susceptibilidad a drogas(21) Cuando se solicitan estos estudios, el clínico debe conocer ciertos conceptos básicos:

La resistencia de las micobacterias es independiente de la exposición a antibióticos antituberculosos. La frecuencia de cepas mutantes resistentes en un cultivo, se ha estimado que es del orden de 1 en 10⁶ para isoniazida, 1 en 10⁸ para estreptomycin y 1 en 10⁸ para isoniazida + estreptomycin.

Como una cavidad abierta puede tener una población de bacilos de 10⁶ a 10⁹ (P, potencialmente 10⁹) a 10⁶ pueden ser resistentes a isoniazida y 10⁶ a 10⁸ a estreptomycin. Por esta razón es que se usan tratamientos con más de una droga. También, cuando el paciente no toma una de las medicinas, rápidamente los bacilos se vuelven resistentes.

Actualmente hay unas 10 a 12 drogas anti-tuberculosas, de ellas, cuatro son consideradas medicamentos de primera línea (isoniazida, estreptomycin, rifampicina y etambutol). Otras son drogas de segunda línea, (etionamida) capreomicina, kanamicina, pirazinamida y ácido paminosalicílico) y se usan cuando se demuestra resistencia primaria a las drogas del primer grupo.

Además de conocer la resistencia primaria a drogas, las pruebas de susceptibilidad también están indicadas para orientar el reajuste del régimen terapéutico cuando el paciente no responde al tratamiento.

La técnica para evaluar la susceptibilidad de las micobacterias a las drogas antituberculosas es diferente de las técnicas para estudiar las bacterias comunes. El principio del método de susceptibilidad proporcional para micobacterias se basa en que si más del 10% de una población de micobacterias muestra resistencia in vitro a un agente antituberculoso, la infección no responderá favorablemente al uso de ese medicamento.

NUEVAS TENDENCIAS:

En laboratorios avanzados actualmente se están utilizando métodos para el diagnóstico bacteriológico rápido de la tuberculosis, por ejemplo, me-

dante la detección radiométrica automática de productos metabólicos del bacilo en el sistema BACTEC, se puede acortar el tiempo para su detección en muestras clínicas (23). También se están utilizando métodos rápidos para la identificación del bacilo una vez aislado en cultivo por los métodos convencionales, por ejemplo utilizando cromatografía de gas (24) Mas recientemente se ha introducido un método de ensayo inmunoenzimático para la detección de antígeno del bacilo de la tuberculosis en forma soluble en muestras clínicas, particularmente en el líquido cefalorraquídeo (25)

Estos procedimientos poco a poco encontrarán su aplicación rutinaria en los laboratorios clínicos y de salud pública.

AGRADECIMIENTO: A mi padre, el Dr. Carlos A. Javier Santos, por su constante estímulo y permanente entusiasmo y por compartir conmigo las experiencias de su ejercicio profesional en el manejo de niños tuberculosos durante más de treinta años.

REFERENCIAS:

1. R. Y. Keers, Pulmonary Tuberculosis, A Journey down the Centuries. 1978. Bailliere& Tindall, London,
2. Koch R. Die antiologie de Tuberkulose. Mittheilungen dem Kaiserlichen Gesundheitsamte, 1884, 2:1-88 (Traducido al inglés en: T. Brock, Milestones in Microbiology, 1961 American Society for Microbiología Washington D.C. p. 116).
3. Koch R. Die antiologie de Tuberkulose. Berliner Klinischen Wochenschrift. 1882, 9 (No. 15): 221-230 (Traducido al inglés en: T. Brock, Milestones in Microbiology, 1961 American Society for Microbiology, Washington D.C. p. 109)
4. Ehrlich P. Deutsche Medizinische Wochenschrift 1882, 8:269-270 (Traducido al inglés en T. Brock Milestones in Microbiology, 1961 American Society for Microbiology, Washington D.C., p. 118).
5. Kubica GP, Gross WM, Hawkins JM, Sommers HM, Vestal AL, Wayne LG. Laboratory Services for Mycobacterial Diseases. Am. Rev. Resp. Dis. 1975, 112:773-787.
6. Alien BW, Darrell JH. Contamination of specimen container surfaces during sputum collection. J. Clin. Path. 1983,36:478-481.
7. Weismuller PC, Olinger D, Ratanaprakam S. Aerosol sputum induction in bacteriological monitoring of pulmonary tuberculosis. Public Health Reports 1983, 98:616-617.
8. Murray PR, Washington JA. Microscopic and Bacteriological analysis of expectorated sputum, Mayo Clin. Proc. 1975:50:339.
9. Katz S, Lifshits S. Diagnostic importance of Bone Marrow examination in acute tuberculosis with haematogenous dissemination. Med, Clin. North. Am. 1950, 1817-1826.
10. Layfield LJ, Glasgow BJ, DuPuis MH. Fine Needle aspiration of lymphadenopathy of suspected infectious etiology. Arch. Path. Lab. Med. 1985,109:810-812.
11. Bailey TM, Akhtar M, Ali M. Fine Needle aspiration biopsy in the diagnosis of tuberculosis. Acta Cytol 1985, 29:732-736.

12. American Thoracic Society. Diagnostic Standards and Classification of tuberculosis and other mycobacterial diseases. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1981,123:343.
13. Smithwick RW, Stratigos CB. Acid-fast microscopy on polycarbonate membrane filter sediments. *J. Clin. Microbiol.* 1981,13:1109-1113.
- 14 Krasnow I , Wayne LG. Spectrum digestion. I. the mortality rate of tubercle bacilli in various digestion systems. *Am. J. Clin. Path.* 1966, 45:352-355.
15. Rickman TW, Moyer NP. Increased sensitivity of Acid-fast smears. *J. Clin. Microbiol.* 1980, 11:618-620.
16. Chafe Kim T, Blackman RS., Heatwole KM., et al. Acid fast bacilli in sputum smears of patients with pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. Resp.,Dis.* 1984, 129:264-268,
17. Kubica GP. *Clinical Microbiology*, cap. 7 en: G.P. Kubica , L. Wayne, *The Mycobacteria*, 1985. Marcell Dekker, New York, p. 133-175.
18. Somers H.M. Good RC. *Mycobacterium*, cap. en: E.H. Lennette, A. Balows, WJ Hausle HJ Shadomy Editores. *Manual of Clinical Microbiology* 4 ed. 1985 American Society for Microbiology, Washington DCp.
19. A.L. Vestal *Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria U.S.* DHEW/PHS publication (CDC) 75-8530, Atlanta 1975.
20. Hawkins JE. Drug susceptibility testing, cap. 8 en: *Íbid* 17p. 177-193.
- 21.- Ramírez Castañeda O. Canalización del conducto torácico para el diagnóstico de la tuberculosis abdominal. Tesis, Facultad de Ciencias Médicas UNAH. Tegucigalpa, 1967.
22. Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, et al. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast positive specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1983, 18:689-696.
23. Tisdall PA, DeYoung DR, Roberts GD, Anhalt JP. Identification of Clinical Isolates of mycobacteria with gas-liquid chromatography. A 10 month follow up study. *J. Clin. Microbiol.* 1982,16:400.
24. Kadival GV, Mazarelo T, Chaparas SD. Sensitivity and Specificity of Enzyme linked immunosorbent-assay in the detection of antigen in tuberculous meningitis cerebrospinal fluids. *J. Clin. Microbiol.* 1986, 23:901-904.