



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA ACADEMICA PROFESIONAL DE TECNOLOGIA  
MÉDICA  
AREA DE LABORATORIO CLINICO Y ANATOMIA PATOLOGICA**

**“IDENTIFICACIÓN DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* POR  
INMUNOCROMATOGRAFÍA CAPILIA®TB EN CULTIVOS DE  
PACIENTES CON DIAGNÓSTICO VIH/TUBERCULOSIS Y  
TUBERCULOSIS MULTIDROGORRESISTENTE  
LIMA, 2015”**

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE LICENCIADO TECNOLOGO  
MEDICO EN EL AREA DE LABORATORIO CLINICO Y ANATOMIA  
PATOLOGICA**

**EDWIN CURI FERNANDEZ**

**ASESOR: Lic. JOSE ALBERTO DIAZ**

**LIMA, PERU**

**2016**

# HOJA DE APROBACIÓN

EDWIN CURI FERNANDEZ

**“IDENTIFICACIÓN DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* POR  
INMUNOCROMATOGRAFÍA CAPILIA®TB EN CULTIVOS DE  
PACIENTES CON DIAGNÓSTICO VIH/TUBERCULOSIS Y  
TUBERCULOSIS MULTIDROGORRESISTENTE  
LIMA, 2015”**

Esta tesis fue evaluada y aprobada para la obtención del título de Licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica por la Universidad Alas Peruanas.

---

---

---

LIMA – PERÚ  
2016

Se Dedicar este Trabajo:

Con amor a mis queridos padres Vidal y Flavia por su incondicional apoyo en cada instante de mi vida.

A mis hnas. Gladys y Edith por su apoyo y colaboración.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNIVERSIDAD ALAS PERUANA alma mater de mi educación superior.

A la Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud por haberme permitido desarrollar la carrera de Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

A los profesores del área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud, que con sus grandes enseñanzas y consejos contribuyeron en mi formación profesional.

Al Laboratorio de Referencia de la Dirección de Salud (DISA) II LIMA SUR sede Magdalena, especialmente al área Micobacterias.

A mi asesor Lic. José Alberto Díaz por su asesoramiento y compartir su experiencia profesional.

**TITULO:** Identificación de *Mycobacterium tuberculosis* por Inmunocromatografía Capilia® TB en cultivos de pacientes con Diagnóstico VIH/Tuberculosis y Tuberculosis Multidrogorresistente Lima, 2015.

**AUTOR:** Edwin Curi Fernández

**ASESOR:** Lic. José Alberto Díaz

### RESUMEN

Debido a que un paciente infectado por el Virus de la Inmuno Deficiencia Humana (VIH) y el bacilo de la tuberculosis (TB), constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de TB activa, presentan mayor susceptibilidad de infectarse con otras micobacterias denominadas micobacterias no tuberculosas (MNT) al igual que pacientes con una TB multidrogorresistente (MDR), surge la necesidad de una identificación rápida de *M. tuberculosis* que permita diferenciarse de las MNT, dado que un cultivo en medio Lowenstein-Jensen no necesariamente significa positivo para *M. tuberculosis* y que las pruebas convencionales de identificación (pruebas bioquímicas) tardan en proveer resultados. En el presente estudio se identificó el *Mycobacterium tuberculosis* por Inmunocromatográfica Capilia® TB a partir de cultivos positivos de pacientes con diagnóstico VIH/TB y TB MDR según ficha clínica, remitidas de los diferentes Centros de Salud de la DISA II LIMA SUR sede magdalena. El estudio fue de tipo descriptivo transversal.

A cada subcultivo se le realizó la prueba Capilia® TB, el mismo que fue comparado con la prueba bioquímica (niacina y nitrato) como prueba de referencia en la identificación de *M. tuberculosis*. De las 166 muestras evaluadas se identificaron 160 como *M. tuberculosis* y 6 cultivos como MNT, determinándose valores de 100% de sensibilidad, 75% de especificidad y 85% de concordancia entre ambas pruebas. Se obtuvo un resultado discordante para la prueba bioquímica (nitrato negativo), por lo que se tuvo que recurrir a una tercera prueba molecular (PCR-Heminested) llegándose a determinar *M. tuberculosis*. Asimismo se identificó 6 especies de MNT (*Complejo M. avium-intracellulare*, *Complejo M. terrae* y *M. zulgai*) en muestras de pacientes VIH/TB.

Finalmente Capilia® TB constituye una herramienta diagnóstica alternativa para la identificación rápida de *M. tuberculosis* por su rapidez y practicidad.

**Palabras clave:** *M. tuberculosis*, MNT, prueba Capilia® TB, prueba bioquímicas, VIH, TE MDR.

## ABSTRACT

Because an infected Virus Human Immunodeficiency (HIV) and tuberculosis bacillus (TB) patients are a risk factor for developing active TB, have increased susceptibility to infection with other mycobacteria called nontuberculous tuberculous (MNT) as TB patients with multidrug (MDR), the need for rapid identification of *M. tuberculosis* that allows differentiated from MNT, as a culture among Lowenstein-Jensen does not necessarily mean positive for *M. tuberculosis* and conventional identification tests (biochemical tests) are slow to provide results. In the present study *Mycobacterium tuberculosis* was identified by immuno Capilia® TB positive cultures from patients with HIV / TB and MDR TB diagnosis based on clinical records, sent from different Health Centers II LIMA SUR cupcake DISA headquarters. The study was descriptive cross.

Each subculture was performed Capilia® TB test, the same as was compared with biochemical test (niacin and nitrate) as a reference test in identifying *M. tuberculosis*. Of the 166 samples tested 160 were identified as *M. tuberculosis* and 6 cultures as MNT, determining values of 100% sensitivity, 75% specificity and 85% concordance between the two tests. A jarring result for the biochemical test (negative nitrate) was obtained, which had to resort to a third molecular testing (PCR-heminested) getting itself to determine *M. tuberculosis*. 6 species of NTM (*M. avium-intracellulare* Complex, Complex *M. terrae* and *M. zulgai*) also identified in samples of HIV / TB patients.

Finally Capilia® TB is an alternative for rapid identification of *M. tuberculosis* for its speed and practicality diagnostic tool.

**Keywords:** *M. tuberculosis*, NTM Capilia® TB test, biochemical test, HIV, MDR TB.

## INDICE

CARATULA.....	1
HOJA DE APROBACION.....	2
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTO.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE CONTENIDO (INDICE).....	9
<b>CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACION</b>	
1.1. Planteamiento de Problema .....	10
1.2. Formulación del Problema.....	11
1.2.1 Problema General.....	11
1.2.2 Problema Específicos.....	11
1.3. Objetivos de la Investigación .....	12
1.3.1 Objetivo General .....	12
1.3.2 Objetivo Específicos.....	12
1.4. Justificación.....	12
<b>CAPITULO II MARCO TEORICO</b>	
2.1 Bases Teóricas .....	14
2.2 Antecedentes .....	25
<b>CAPITULO III METODOLOGIA</b>	
3.1 Diseño del Estudio .....	27
3.2 Población .....	27
3.2.1 Criterios de Inclusión.....	27
3.2.2 Criterios de Exclusión.....	27
3.3 Muestra.....	27
3.4 Muestreo.....	27

3.5	Operacionalización de Variables. ....	28
3.6	Procedimientos y Técnicas .....	30
3.7	Plan de Análisis de Datos .....	33
CAPITULO IV DISCUSION DE RESULTADOS		
4.1	RESULTADOS.....	34
4.2	DISCUSION DE RESULTADOS.....	37
4.3	CONCLUSIONES.....	41
4.4	RECOMENDACIONES.....	42
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....		43
ANEXOS N° 1.....		48
ANEXOS N°2.....		49
ANEXOS N°3.....		50
ANEXOS N°4.....		52
ANEXOS N°5.....		53
ANEXOS N°6.....		59
ANEXOS N°7.....		60
ANEXOS N°8.....		61
MATRIZ DE CONSISTENCIA.....		62



## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Identificación de *M. tuberculosis* con la prueba bioquímica de referencia según tipo de muestra. .... 34
- Tabla 2.** Identificación de *M. tuberculosis* con el método Capilia® TB según tipo de muestra..... 34
- Tabla 3.** Resultados de evaluación diagnóstica de la prueba Inmunocromatográfica Capilia® TB para la identificación de *M. tuberculosis* en cultivos positivos de pacientes con diagnóstico VIH/Tuberculosis y cultivos positivos de pacientes con Tuberculosis Multidrogorresistente.2015..... 35
- Tabla 4.** Resultados de concordancia entre la prueba Capilia® TB y las pruebas bioquímicas en la identificación de *M. tuberculosis* en cultivos positivos VIH/TB y TB MDR..... 35
- Tabla 5.** Correlación entre la prueba Capilia® TB y las pruebas bioquímicas en la identificación de *M. tuberculosis* en cultivos positivos VIH/TB y TB MDR..... 36
- Tabla 6.** Identificación de Micobacterias No Tuberculosas identificadas por pruebas bioquímicas en cepas VIH/TB..... 36

# CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACION

## 1.1 Planteamiento de Problema

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) que persiste como uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Se estima que alrededor de un tercio de la población mundial, dos mil millones de personas, están infectadas con MTB. De acuerdo con el último reporte de 2014 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la TB sigue siendo una de las enfermedades transmisibles de mayor mortalidad en el mundo. En 2013, se estimó que 9 millones de personas desarrollaron TB y 1,5 millones murieron por esta causa, de los cuales 360.000 eran VIH-positivos. Alrededor del 60% de los casos y muertes por Tuberculosis ocurren entre los hombres, pero la carga de la enfermedad entre las mujeres también es alta. A nivel mundial, la proporción de nuevos casos de TB multirresistente (TB-MDR) fue 3,5% en 2013 y no ha cambiado en los últimos años.<sup>1</sup>

El impacto de la pandemia del VIH y TB MDR ha agravado esta situación, en donde la infección por el VIH es el principal riesgo asociado al desarrollo de la TB en personas con reinfección tuberculosa y reactivación en personas con tuberculosis latentes<sup>2, 3</sup>.

La persistencia de la tuberculosis (TB) está asociada a varios factores, entre los que se destacan los problemas socioeconómicos, descuido en los programas de control y vigilancia de la TB, la falta de adherencia al tratamiento antituberculosis, el aumento de la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el bacilo *M. tuberculosis*, y el creciente incremento de la tuberculosis multidrogo resistente (TB MDR), definida como cepas de *mycobacterium tuberculosis* (MTB) resistentes a isoniazida (INH) y rifampicina (RIF), con o sin resistencia a otras drogas antituberculosis y por último la TB extremadamente-resistente (XDR), definida cuando la bacteria que es multidrogo resistente (MDR), ha ampliado su resistencia a por lo menos dos de las drogas más efectivas de segunda línea: una fluoroquinolona (ciprofloxacina, levofloxacina o moxifloxacina) y una droga inyectable (amikacina, kanamicina o capreomicina)<sup>4, 5</sup>. La principal causa de la presencia de TB MDR en

personas con VIH está asociada a transmisión nosocomial.<sup>6,7</sup> Y, también debido a una mala absorción de las drogas antituberculosis<sup>8</sup>.

El MTB es el agente causal de la TB, pero hay varias especies de micobacterias no tuberculosas (MNT), que pueden causar la enfermedad parecida a la TB, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos, particularmente en pacientes con el Síndrome de la Inmunodeficiencia Humana (SIDA)<sup>9,10</sup>. Debido a que las infecciones causadas por las MNT, presentan manifestaciones clínicas parecidas a la TB, es crítico hacer una rápida identificación de *M. tuberculosis* y por consiguiente la diferenciación de las MNT para orientar las medidas preventivas y adopción de una correcta terapia antituberculosis específica en los pacientes, permitiendo su pronta recuperación y evitando una posible diseminación de la enfermedad<sup>10</sup>.

## 1.2 Formulación del Problema

### 1.2.1 Problema General

¿Cómo identificar el *Mycobacterium tuberculosis* por Inmunocromatográfica Capilia® TB a partir de cultivos positivos de pacientes con diagnóstico VIH/Tuberculosis y TB MDR?

### 1.2.2 Problema específico

- ¿Cuál es la sensibilidad y especificidad, del método Inmunocromatográfico Capilia®TB frente a la prueba de referencia bioquímica (niacina y nitrato) para la identificación de *Mycobacterium Tuberculosis*?
- ¿Cuál es la concordancia entre la prueba Capilia®TB y la prueba bioquímica en la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*?
- ¿Cuáles son las Micobacterias No Tuberculosas (MNT) en cultivos VIH/TB con pruebas bioquímicas y enzimáticas?

## 1.3 Objetivos de la Investigación

### 1.3.1 Objetivo General

Identificar el *Mycobacterium tuberculosis* por Inmunocromatográfica Capilia® TB a partir de cultivos positivos de pacientes con diagnóstico VIH/TB y TB MDR

### 1.3.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la sensibilidad y especificidad, del método Inmunocromatográfico Capilia®TB frente a la prueba de referencia bioquímica (niacina y nitrato) para la identificación de *Mycobacterium Tuberculosis*?
- Determinar la concordancia entre la prueba Capilia®TB y la prueba bioquímica en la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Identificar las Micobacterias No Tuberculosas (MNT) en cultivos VIH/TB con pruebas bioquímicas y enzimáticas.

## 1.4 Justificación

Muchos laboratorios de referencia realizan la identificación de MTB, mediante el análisis de las características fenotípicas y bioquímicas, las cuales resultan en ocasiones laboriosas, peligrosos por trabajar con cultivos viables y reactivos tóxicos y demoran de 2 a 3 días para la identificación de *M. tuberculosis* y de 3 a 6 semanas en obtener resultados cuando se identifican MNT<sup>13, 14, 15</sup>. Por otro lado existen diferentes métodos de identificación tales como: sistemas de cultivos líquidos BACTEC 960 que son automatizados, sin embargo, estas técnicas son costosas e implican tener suficiente conocimiento para el manejo de equipos sofisticados<sup>10 16</sup>.

Los métodos moleculares, como la utilización de sondas de ácidos nucleicos pueden identificar MTB a partir de cultivos sólidos y/o líquidos, pero son costosas. La Prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es un método que detecta e identifica MTB a partir de muestras clínicas en poco tiempo con gran precisión, no obstante, estos métodos son complejos con procedimientos técnicamente dificultosos

que requieren instrumentos y equipos especializados, además de operadores capacitados<sup>10, 16</sup>.

Debido a las circunstancias, es necesaria la rápida identificación de *M. tuberculosis* discriminándola de otras MNT. Capilia®TB es un nuevo método Inmunocromatográfico que permite la rápida identificación y discriminación del complejo *M. tuberculosis* de las MNT, utilizando para ello anticuerpos monoclonales para detectar el antígeno MPB64, que es una de las proteínas predominantes secretadas al medio de cultivo sólido o líquido únicamente por especies que pertenecen al complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis*, *BCG*, *M. africanum*, *M. microti*) durante el cultivo.

La posibilidad de disponer de un método de identificación sencillo, rápido y eficaz para la identificación de *M. tuberculosis* a partir de cultivos, además elimina el riesgo que significa el uso de reactivos de alta toxicidad de método convencional bioquímica y consecuentemente este kit Capilia® TB es una buena opción para el uso rutinario en los diferentes laboratorios a nivel nacional.

BD MGIT™ TBc Test de Identificación es esencial disponer de un método rápido para diferenciar *M. tuberculosis* complex de otras micobacterias. Una identificación en tiempo de Mtbc guiará una terapia inicial y conllevará unos mejores resultados del paciente. BD MGIT™ TBc Test de Identificación rápido: resultados en solo 15 minutos. Sencillo solo añadir 100 uL de un tubo BD MGIT positivo en el lateral del dispositivo. Económico, más económico y eficaz en tiempo que los métodos moleculares. Versátil, no necesita equipamiento adicional o técnicos especializados<sup>44</sup>.

El sistema BD BACTEC™ MGIT™ utiliza un cultivo líquido y se acorta drásticamente el tiempo de recuperación de micobacterias cultura de aproximadamente 10-14 días, en comparación con un máximo de seis semanas de cultivo sólido tradicional<sup>44</sup>.

Los Costos del BD MGIT™ TBc Test de Identificación equivalen alrededor de 1000 soles para 25 pruebas cuyo proveedores es Becton Dickinson del Uruguay Mercantil Lab.

## **CAPITULO II MARCO TEORICO**

### **2.1. Bases Teóricas:**

## **La tuberculosis:**

La TB pulmonar es una enfermedad infectocontagiosa causada principalmente por la bacteria *M. tuberculosis*. La TB puede afectar a cualquier órgano del cuerpo, siendo el más comúnmente afectado el pulmón (TB pulmonar), con 80-85% de todos los casos diagnosticados, debido a que el bacilo necesita abundante oxígeno para multiplicarse. La TB se transmite por vía aérea, mediante la inhalación de gotitas que contienen bacterias viables que son expulsadas al toser, estornudar, hablar o escupir por las personas afectadas con la TB pulmonar<sup>13, 21</sup>.

Los síntomas más característicos de la TB pulmonar son la tos y la expectoración persistente por más de 15 días. A las personas con estos síntomas se les llama sintomáticos respiratorios (SR). Otras manifestaciones pueden ser la pérdida de peso, febrículas, sudores nocturnos, cansancio físico y dolores del tórax<sup>13</sup>.

### **Características generales de las micobacterias**

Las micobacterias se adscriben taxonómicamente al género *Mycobacterium* único de la familia Mycobacteriaceae, perteneciente al orden Actinomycetales<sup>4, 14</sup>. Las micobacterias son microorganismos aerobios, inmóviles y no esporulados, rectos o ligeramente curvos, a veces ramificados, que pueden presentar crecimiento filamentosos y obtienen la energía de la oxidación de compuestos sencillos de carbono<sup>13</sup>. La pared posee un alto contenido de lípidos y ácidos micólicos que la hace impermeable a los agentes hidrofílicos. Las micobacterias son teñidas adecuadamente por la técnica de Ziehl-Neelsen, una vez coloreadas son resistentes a la decoloración con alcohol ácido-alcohol, y por eso se denominan Bacilo Ácido Alcohol Resistentes (BAAR)<sup>4, 21</sup>.

Tienen una velocidad de crecimiento mucho más lenta que la mayoría de las bacterias. Forman más de una clase de colonias, estas pueden ser rugosas, color crema, elevadas, convexas, de bordes irregulares con bacilos densos y compactos (MTB), o pueden ser lisas o transparentes con bacilos sin agrupaciones discernibles (*M. intracellulare*), o de aspereza intermedia (*M. kansasii*)<sup>4, 14</sup>.

### **Complejo *Mycobacterium tuberculosis***

El complejo *M. tuberculosis* incluye a un grupo de micobacterias que presentan > 95% de homología en su DNA y que designa como complejo *M. tuberculosis*, compuesto

por las especies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, (incluida la cepa BCG variante de laboratorio utilizada en vacunación) *M. africanum*, causante de la TB en África tropical, *M. microti*, causante de la TB en roedores, auquénidos y otros mamíferos, recientemente fueron identificadas tres subespecies de *M. tuberculosis*: *M. caprae*, *M. canettii*, *M. pinnipedi*<sup>4,14</sup>.

Habitualmente se utiliza el término *M. tuberculosis* como sinónimo de todas las especies que conforman el complejo, ya que se identifican en la mayoría de los laboratorios con pruebas moleculares (hibridación de sonda de ADN), común para todo el complejo *M. tuberculosis* y porque el aislamiento de cualquiera de ellos en muestras clínicas establece, por sí mismo el diagnóstico de TB en el paciente. Sin duda la TB causada por MTB es la más importante desde el punto de vista sanitario<sup>14</sup>.

El MTB es un bacilo delgado, ligeramente curvo, de 2 a 4 µm de longitud y 0,2 a 0,5 µm de diámetro, intracelular obligado, aerobio lo que determina que tenga una capacidad de metabolización y crecimiento muy diferente según la tensión parcial de oxígeno del órgano o lesión donde se anide, inmóvil, de crecimiento muy lento por lo que la enfermedad puede llegar a la cronicidad, no tiene toxinas, por lo que puede permanecer en bacteriostásis por largos períodos en el interior de las células, tiene virulencia variable. El MTB tiene un tiempo de generación de 18 horas, por lo que necesita entre 3 a 4 semanas de incubación a 37 °C para formar colonias visibles microscópicamente. No produce cápsula de polisacáridos<sup>21</sup>.

### **Micobacterias no tuberculosas (MNT)**

Son un grupo de especies del género *Mycobacterium* diferentes a las especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, llamadas también micobacterias atípicas o ambientales, pueden ser saprofitas, patógenas y oportunistas, así mismo son causantes de infecciones tanto en pacientes inmunocomprometidos, como inmunocompetentes<sup>22</sup>. Las MNT pueden estar ampliamente distribuidas en el medio ambiente, fundamentalmente en el agua, suelo, polvo, leche, alimentos, pájaros entre otros animales y en la tierra, de la misma manera que pueden habitar en superficies corporales y secreciones sin causar enfermedad <sup>21</sup>.

Las infecciones causada por las MNT se denominan micobacteriosis, se localizan generalmente en los pulmones, sistema linfático, la piel o el tejido óseo, pudiendo ser diseminadas. Las más comunes son las asociadas a procedimientos posquirúrgicos, entre las que se describen los procedimientos estéticos, como masoterapia y lipoesculturas, la aparición de abscesos después de una inyección, las infecciones asociadas con catéteres. En algunos casos indistinguibles clínicamente de la TB, que afectan especialmente a pacientes infectados con el VIH<sup>15, 23</sup>.

Se han identificado más de 125 especies de MNT, las cuales se dicen que 60 producen enfermedades importantes sobre todo en pacientes inmunodeprimidos, fundamentalmente por el VIH<sup>21</sup>. En la literatura internacional se mantiene a *M. avium* y *M. fortuitum* como las especies micobacterianas de mayor incidencia de aislamientos en humanos, principalmente en pacientes inmunosuprimidos, en países como USA *M. avium* en un patógeno oportunista frecuente y de difícil tratamiento<sup>24</sup>. Otras especies principales aisladas en pacientes inmunosuprimidos son: *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. marinum*, *M. fortuitum-chelonae*, *M. celatum*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, etc.<sup>15,22</sup>.

<b>Grupo</b>	<b>Descripción</b>
<b>Fotocromógenas</b>	Crecimiento lento, colonias no pigmentadas en la oscuridad; los cultivos jóvenes adquieren color amarillo al exponerlos a la luz: <b><i>M. kansasii</i></b>
<b>Escotocromógenas</b>	Crecimiento lento, colonias pigmentadas amarillentas o anaranjadas en la oscuridad: ( <b><i>M. gordonae</i>, <i>M. szulgai</i>, <i>M. scrofulaceum</i>, <i>M. flavescens</i></b> ).
<b>No cromógenas</b>	Crecimiento lento, colonias generalmente no cromógenas o debilmente pigmentadas: ( <b><i>M. avium</i>, <i>M. intracellulare</i>, <i>M. gastri</i>, <i>M. terrae</i>, <i>M. triviale</i></b> ).
<b>De crecimiento rápido</b>	Crecimiento en los medios de cultivo en menos de 7 días. Donde se detectan Micobacterias no cromógenas ( <b><i>M. fortuitum</i>, <i>M. chelonae</i></b> ),



	escotocromógenas ( <i>M. phlei</i> ) y fotocromógenas ( <i>M. vaccae</i> ).
--	-----------------------------------------------------------------------------

#### **Clasificación de Runyon de las Micobacterias no Tuberculosas**

La probabilidad de sospecha de infección por estas MNT aumenta cuando:

- Se obtienen varios cultivos de la misma cepa y de un mismo sujeto, en ausencia de MTB.
- Los cultivos obtenidos presentan un desarrollo abundante.
- Existe enfermedad comprobada.
- Se observa mala respuesta al tratamiento antituberculosis.
- Se obtiene cultivo puro a partir de una lesión cerrada, de la cual se obtuvo la muestra por manipulación estéril.

#### **Relación infección-enfermedad**

Desde el punto de vista clínico, cuando la infección ha sido controlada por el sistema inmune, los sujetos inmunocompetentes desarrollan un equilibrio entre el bacilo y el organismo, que actúa hasta que una circunstancia predisponente sea capaz de reactivar la infección. Sin embargo, los individuos inmunodeficientes no son capaces de controlar la infección, desarrollando la enfermedad<sup>2</sup>.

#### **Coinfección VIH y Tuberculosis**

La infección por el VIH y el bacilo de la TB constituyen una combinación letal, ya que se potencian mutuamente. La infección por el VIH debilita el sistema inmunitario. La TB es una de las principales causas de muerte entre las personas que viven con VIH/SIDA, facilitando la progresión a SIDA y la infección por el VIH es el principal factor de riesgo más potente para la reactivación de la TB en personas con una infección tuberculosa latente.<sup>2, 27, 28</sup> La infección por el VIH puede causar directamente un incremento en los casos de TB debido a que personas con infección por VIH son más susceptibles a una reactivación endógena de la TB latente (verdadera recaída) o a una reinfección exógena (contagio reciente). En países con elevada morbilidad por TB la reinfección exógena es más frecuente en inmunocomprometidos<sup>22</sup>.

#### **Interacción entre *Mycobacterium tuberculosis* y VIH**

El MTB es un patógeno intracelular y reside primariamente en los macrófagos. Dado que la infección por el VIH afecta la inmunidad celular, se constituye como un factor de riesgo más potente para la reactivación de la infección latente por MTB. El mecanismo primario por el cual se inhibe la replicación del *M. tuberculosis*, y por el cual es destruido finalmente, es la activación de los macrófagos por la liberación de gamma interferón desde los linfocitos T activados CD4+ y CD8+<sup>2, 29</sup>.

Existe evidencia disponible demuestra que los linfocitos T CD4+ son esenciales para la inmunidad protectora contra *M. tuberculosis*, el VIH infecta y destruye a los CD4+ haciendo que su población disminuya conforme la infección progresa. Así aumenta el riesgo de la enfermedad por TB e infección micobacteriana diseminada<sup>29</sup>.

### **Resistencia en *Mycobacterium tuberculosis***

La resistencia de MTB a los medicamentos antituberculosis se produce de forma natural por medio de mutaciones espontáneas en el cromosoma bacteriano. De no haber exposición a los antimicrobianos, hay muy pocos microorganismos farmacorresistentes naturales, en comparación con una gran cantidad de formas sensibles a los fármacos en cuestión. En toda población de células sensibles, existe una pequeña proporción de mutantes resistentes por cada generación, que varía en dependencia de la droga a la cual se manifiesta la resistencia<sup>4</sup>.

### **Tuberculosis Multidrogorresistente (TB MDR)**

La TB MDR es una de las formas más graves de la enfermedad ocasionada por MTB resistente a por lo menos a dos de los medicamentos antituberculosis más efectivos y eficaces: INH y RIF<sup>5</sup>.

### **Tuberculosis Extremadamente Resistente (TB XDR)**

La TB XDR, está definida como una forma grave de la TB causada por la bacteria que tiene resistencia extendida, es decir tiene resistencia a INH, RIF, más alguna fluoroquinolona (ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina) y un inyectable (kanamicina, capreomicina o amikacina). El control de esta enfermedad es más difícil y costoso, y puede llegar a ser incurable<sup>5</sup>.

### **Epidemiología**

De acuerdo con el último reporte de 2014 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la TB sigue siendo una de las enfermedades transmisibles de mayor mortalidad en el mundo. En 2013, se estimó que 9 millones de personas desarrollaron TB y 1,5 millones murieron por esta causa, de los cuales 360.000 eran VIH-positivos. Sin embargo, de este estimado de personas con la enfermedad, sólo 6.116.536 fueron diagnosticadas y reportadas por los servicios de salud, dejando una brecha de aproximadamente tres millones de personas sin diagnóstico. Entre los afectados se encuentran poblaciones en alta vulnerabilidad como migrantes, mineros, usuarios de drogas, fumadores y personas con otras patologías como el VIH y la diabetes, entre otros. Alrededor del 60% de los casos y muertes por Tuberculosis ocurren entre los hombres, pero la carga de la enfermedad entre las mujeres también es alta. En 2013, un estimado de 510.000 mujeres murieron a consecuencia de la TB, más de un tercio de las cuales eran VIH-positivas y se presentaron 80.000 muertes por tuberculosis entre niños VIH-negativos en el mismo año<sup>1</sup>. En el año 2013 en el Perú, la tasa anual de coinfección TB-VIH 4.1 casos por 100 000 habitantes. Morbilidad TB: 31052 Casos. TB-VIH/SIDA 4%<sup>42</sup>

### **Diagnóstico**

La investigación bacteriológica de la tuberculosis comprende la realización de las pruebas bacteriológicas como: El examen directo (baciloscopía), el cultivo, la prueba de susceptibilidad e identificación de las micobacterias <sup>22, 32</sup>.

El cultivo es el método bacteriológico más sensible y específico, aumenta la sensibilidad de la baciloscopía en un 30 a 60%<sup>14</sup>.

La prueba de susceptibilidad es un examen para determinar la susceptibilidad de una cepa de *M. tuberculosis* a los fármacos antituberculosos. Los métodos de susceptibilidad in Vitro juegan un papel primordial en el monitoreo de la resistencia a las drogas antituberculosas y en la selección de la terapia adecuada<sup>30</sup>.

El método de proporciones Agar en Placa, permite determinar la proporción de mutantes resistentes a una determinada droga que existe en una población bacteriana. Es un método indirecto, que consiste en inocular cantidades iguales de varias diluciones de un inóculo estandarizado en placas que contienen Agar base Middlebrook 7H10 sin drogas (placas controles) y placas conteniendo drogas, lo cual

permitirá observar colonias separadas y contables en los cuadrantes controles y en los cuadrantes conteniendo drogas. El número de crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) en el medio conteniendo droga, comparado con el crecimiento en el medio sin droga se cuantifica y se expresa en porcentaje. Las cepas que crecen en medio conteniendo drogas en una proporción mayor del 1% serán consideradas como “resistentes”<sup>33</sup>.

Una vez que se ha detectado crecimiento en los medios de cultivo, se realiza la tinción de Ziehl Nelsen (Z-N) para verificar presencia de Bacilos Alcohol Acido Resistente (BAAR). Actualmente existen numerosas pruebas de identificación, siendo uno de ellos las sondas genéticas debido a su rapidez, precisión y simplicidad<sup>14</sup>.

Tradicionalmente la identificación se realiza en base a una serie de características fenotípicas. La velocidad de crecimiento en los cultivos y la temperatura optima, morfología de las colonias, la pigmentación son aspectos importantes en el proceso de la tipificación de las micobacterias, posteriormente se realizan pruebas bioquímicas y enzimáticos<sup>12</sup>.

La aplicación de algunas pruebas bioquímicas relativamente sencillas permitiría, en este caso, conseguir la identificación de especie. Además, otras ventajas de las pruebas bioquímicas son la sencillez, economía y el no requerir un gran equipamiento<sup>39</sup>.

La niacina (ácido nicotínico) juega un rol vital en las reacciones de oxidación-reducción que ocurre durante la síntesis metabólica en todas las micobacterias. Estas funciones son precursores de la biosíntesis de coenzimas (ribonucleótido de niacina), aunque todas la micobacterias producen niacina como un derivado metabólico. *M. tuberculosis*, *M. bovis* y otras cepas como *M. marinum* y *M. chelonai* carecen de esta enzima y acumulan niacina como un derivado soluble en agua en el medio de cultivo<sup>32, 34, 35</sup>.

Las micobacterias difieren en su capacidad para reducir los nitratos a nitritos mediante la presencia de una enzima nitrato reductasa. Es muy útil para diferenciar las especies de micobacterias de crecimiento rápido, así como algunas de crecimiento lento (*M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, etc.). La presencia de

nitrito es detectada por la adición de sulfanilamida y N-naftiletildiamina a pH ácido. Si el nitrito está presente se forma un compuesto rojo de diazonio<sup>32, 34, 35</sup>.

La capacidad de hidrolizar el Tween 80, liberando ácido oleico esterificado contenido en el mismo, permite distinguir entre diversas especies. Cuando se une al Tween 80, el rojo neutro se colorea de ámbar. La hidrólisis del Tween 80 libera el rojo neutro que vuelve a su color rojo original. Es útil en la caracterización de micobacterias de crecimiento lento<sup>34, 35</sup>.

Incorporación o captación del hierro. Se basa en la capacidad de algunas especies de micobacterias (fundamentalmente de crecimiento rápido) de captar el citrato férrico amoniacal y reducirlo a óxido de hierro, adquiriendo un color marrón<sup>34, 35</sup>.

Algunas micobacterias son capaces de crecer en un medio con una concentración del 5% de NaCl, característica que puede ser útil para diferenciarlas de otras especies que no crecen en tales concentraciones<sup>34, 35</sup>.

La arilsulfatasa es una enzima capaz de hidrolizar el enlace entre sulfato y el anillo aromático en un compuesto tal como el disulfato potásico de fenoltaleína. La fenoltaleína libre puede entonces ser reconocida mediante la formación de color rojo cuando se añade un álcali. La mayoría de las micobacterias poseen este enzima, pero las condiciones de la prueba permiten distinguir entre diferentes especies. Es una prueba muy útil en la identificación de micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido concentraciones<sup>34, 35</sup>.

La prueba de Ureasa. Es una prueba colorimétrica que detecta el amonio liberado por la ureasa. La ureasa es una enzima que desdobra la urea produciendo amoníaco. Esta sustancia de naturaleza básica eleva el pH del medio haciendo virar el color del indicador de pH<sup>34, 35</sup>.

Prueba de  $\beta$ - Galactosidasa. Esta prueba demuestra la presencia de la enzima beta-galactosidasa en algunos microorganismos. Si la bacteria posee las enzimas hidrolizantes ( $\beta$  -galactosidasa), el compuesto se transforma en ortonitrofenol, un derivado cromogénico de color amarillo. Todos los gérmenes denominados fermentadores lentos de la lactosa son beta-galactosidasa positivos<sup>34, 35</sup>.

## **Prueba de Inmunocromatografía Capilia®TB**

### **Proteína MPB-64.**

Esta proteína denominada MPB64, es secretada fuera de las células durante el cultivo del complejo *M tuberculosis*. Se sabe que las bacterias alcohol-acido resistentes producen más de 200 proteínas. El equipo de Harboe M. en 1986 reportó las propiedades bioquímicas de varias proteínas incluidas la MPB64 cuyo peso molecular es de 24.000 daltons. Esta proteína MPB64 fue caracterizado como una proteína antigénica por el equipo de Nagai S.1991, a partir de un cultivo filtrado de BCG *M. bovis* el cual es una cepa atenuada de *M. bovis*. Estudios posteriores el análisis genético confirmó que la MPB64 era idéntica a la proteína denominada MPT64 producida por *M. tuberculosis* y se reportó que las MNT no producen dicha proteína MPB64 y que la MPB64 es una proteína secretada específicamente por el complejo *M. tuberculosis* (*M. bovis*, *M. africanum* y *M microtti*)<sup>17</sup>.

### **Fundamento de la prueba Capilia® TB**

La Inmunocromatografía es una técnica inmunológica que permite visualizar la reacción antígeno-anticuerpo por la acumulación de partículas coloidales del conjugado en zonas específicas del papel de nitrocelulosa donde se fijan previamente anticuerpos de captura. Es una técnica tipo “sándwich doble de anticuerpos”, en la cual (i) anticuerpos marcados con partículas coloidales, como oro coloidal, reaccionan con el antígeno objetivo/blanco para formar un complejo antígeno-anticuerpo, (ii) este complejo migra por capilaridad a través del papel filtro de nitrocelulosa y (iii) el complejo es capturado luego por un segundo anticuerpo fijado previamente en el medio del papel de nitrocelulosa. Si los antígenos blanco están presente en la muestra se observa una reacción de cambio de color. Esta reacción es producida por el oro coloidal en el lugar del papel de nitrocelulosa donde se fijó previamente el segundo anticuerpo, y la prueba es considerada positiva<sup>18, 36</sup>.

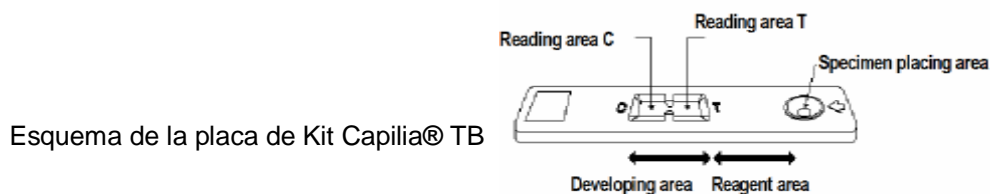
Este kit utiliza anticuerpos monoclonales MPB64 (de ratón), marcados con oro coloidal en el sistema de reacción principal. Los resultados se visualizan directamente como una reacción antígeno-anticuerpo entre los anticuerpos monoclonales y los antígenos MPB64 que fueron secretados por la cepa en la muestra clínica<sup>10, 8, 36</sup>.

## Componentes del Kit Inmunocromatográfico Capilia® TB

Este producto contiene una tira conductora compuesta por (1) zona para colocación de muestra, (2) zona del reactivo que contiene el anticuerpo monoclonal A (ratón) MPB64 marcado con oro coloidal y (3) un área de reacción/resultado, donde el anticuerpo monoclonal B (ratón) Anti-MPB64 y el anticuerpo Anti-inmunoglobulina policlonal de ratón (cabra) son fijados<sup>36</sup>.

Al colocar la muestra (suspensión bacteriana) al área de colocación de la muestra, el anticuerpo monoclonal A anti-MPB64 que está marcado con oro coloidal se disuelve y forma un complejo inmune con el antígeno MPB64 presente en la muestra. Este complejo inmune migra por acción capilar a través del área de reacción y es capturado por el anticuerpo B anti-MPB64 fijo en el área de lectura (T). El complejo resultante forma una línea rojo-violeta, el kit muestra la presencia de antígenos MPB64<sup>36</sup>.

De otro lado, independientemente de la presencia de antígenos MPB64 en la muestra, el exceso de anticuerpos anti-MPB64 marcados con oro coloidal, migrará a través del área de reacción/resultado y será capturado por el anticuerpo anti-inmunoglobulina policlonal de ratón (anticuerpo fijo); el complejo resultante formará una línea rojo violeta en el área de lectura ©. Esto indica que el anticuerpo A anti-MPB64 marcado con oro coloidal ha migrado<sup>36</sup>.



## Tratamiento de la Tuberculosis

El tratamiento aplicado en nuestro país, se basa en diversos regímenes de terapia combinada (varios medicamentos) teniendo en cuenta tres propiedades fundamentales: capacidad bactericida, capacidad esterilizante y capacidad de prevenir resistencia. La Isoniazida y la Rifampicina son consideradas como el núcleo básico del tratamiento antituberculoso, al que se le agregó posteriormente la pirazinamida y ethambutol<sup>22</sup>.

El tratamiento considera dos fases: Primera fase de inducción o bactericida: de administración diaria, sirve para reducir rápidamente la población bacilar de crecimiento y multiplicación rápida y para prevenir la resistencia y con ello el fracaso. Segunda fase de mantenimiento o esterilizante: de administración intermitente, incluye menor número de medicamentos, para la eliminación de bacilos persistentes y evitar las recaídas<sup>22</sup>.

El tratamiento de tuberculosis en pacientes con VIH/SIDA es la misma, sigue los mismos principios que en personas inmunocompetentes, con muy pocas excepciones. Existen algunas particularidades que son necesarias conocer para un manejo adecuado como las interacciones medicamentosas con las drogas antirretrovirales en especial con rifampicina o rifabutina, la aparición del síndrome de reconstitución inmune, y medidas preventivas que es necesario llevar a cabo<sup>2</sup>.

Según la OMS para el tratamiento de las personas que presentan la coinfección TB/VIH, se debe destacar la necesidad de brindar terapia diaria o mínimo tres veces por semana durante la segunda fase de tratamiento con el objetivo de prevenir la aparición de resistencia a rifampicina y evitar la aparición de cepas MDR<sup>2</sup>.

Los regímenes de tratamiento para las MNT aún no se encuentran claramente definidos en muchos casos, y el resultado terapéutico suele ser decepcionante, a pesar de la disponibilidad de nuevos antimicrobianos. La resistencia in vitro de la mayoría de los fármacos antituberculosis de primera línea es una de las características más llamativas de las MNT<sup>15</sup>.

## **2.2 Antecedentes**

Diversos estudios se han realizado para la identificación del complejo *M. tuberculosis* basados en la detección del MPB64, el cual es una proteína inmunogénica altamente específica con un alto valor potencial de diagnóstico para el complejo *M. tuberculosis*, dicha proteína MPB64 ha sido ampliamente estudiada y caracterizada por Yamaguchi en 2009<sup>17</sup>.

En un estudio realizado por el equipo de Abe Ch. en 2009, evaluó un nuevo ensayo inmunocromatográfico comercialmente denominado MPB 64-ICA para la



identificación del complejo *M. tuberculosis* usando anticuerpos monoclonales anti-MPB64, a partir de cepas de referencia aisladas clínicas, utilizando como prueba de referencia sondas de ácidos nucleicos (Método AccuProbe®) para la confirmación de los mismos, determinando valores elevados de sensibilidad y especificidad para la prueba MPB 64-ICA, demostrando así su validez en la identificación rápida de complejo *M. tuberculosis* a partir de cultivos puros y cultivos mixtos, lo que no pudo ser detectado con la prueba bioquímica de niacina<sup>18</sup>.

El equipo de Hasegawa N. en el 2009, evaluó la utilidad clínica de una prueba inmunocromatográfica denominada MPB64-ICA para la confirmación del complejo *M. tuberculosis* con anticuerpos monoclonales anti-MPB64. Diferentes parámetros fueron evaluados: medios de cultivo líquido como el Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT) y sólidos (L-J y Middlebrook 7H10), cultivos positivos primarios, cultivos criopreservados y efecto del tratamiento antituberculosis. El resultado de identificación fue comparado con pruebas cromatográficas y mediante sondas de ácidos nucleicos, obteniendo resultados con altos niveles de sensibilidad y especificidad, lo que sugiere considerar a este método una alternativa disponible para la identificación y diferenciación del complejo *M. tuberculosis* de las MNT<sup>10</sup>.

El equipo de Hillemann D. en 2009, evaluó la utilidad de la prueba Capilia® TB, para la confirmación rápida del complejo *M. tuberculosis* a partir de 172 cultivos positivos para micobacterias, determinando una sensibilidad de 92,4% y especificidad del 100%, frente al método de referencia de sondas de ácidos nucleicos Geno®Type<sup>9</sup>.

Por otro lado, el equipo de Wang J-Y. en 2010 evaluó la capacidad de la prueba Capilia TB y la prueba molecular de sondas de ácidos nucleicos BD ProbeTec (CTB), para la confirmación de cultivos de *M. tuberculosis*, utilizando cultivos líquidos positivos para micobacterias (MGIT), frente a la prueba bioquímica como prueba de referencia, llegándose a determinar una sensibilidad de 98,6% y una especificidad del 97%<sup>11</sup>.

De igual manera el equipo de Nagamlert K. en el 2012, evaluó el costo, tiempo y desempeño diagnóstico de la prueba Capilia TB para la identificación del complejo

*M. tuberculosis* en 247 cultivos, obteniendo una sensibilidad de 97% y una especificidad de 100% comparado con pruebas bioquímicas como prueba referencial<sup>19</sup>.

El equipo de Shen G-H en 2012, determinó si la prueba Capilia TB podía reemplazar al sistema de detección molecular de sondas de ácidos nucleicos BD ProbeTec (CTB) en la identificación del complejo *M. tuberculosis* en 233 cultivos líquidos (MGIT) positivos para micobacterias en el sistema BÁCTEC 960 positivos para micobacterias, obteniendo cifras de 96,9% de sensibilidad y 99,4% de especificidad frente a una sensibilidad de 99,4% y especificidad de 97,3% para el sistema de detección molecular de sondas de ácidos nucleicos BD ProbeTec usado como prueba referencial<sup>20</sup>.

El equipo de Brent A. 2014, realizó un estudio de metanálisis demostrando que la inmunocromatografía Capilia TB tiene una sensibilidad del 97-99% y una especificidad del 99-100% en aislamientos clínicos.<sup>43</sup>

## **CAPITULO III METODOLOGIA**

### **3.1 Diseño del Estudio**

Estudio de tipo descriptivo transversal

### **3.2 Población**

3.2.1 La población del estudio estuvo conformada por todos los cultivos positivos a micobacterias provenientes de pacientes con diagnóstico VIH/TB y cultivos positivos de pacientes con TB/MDR según ficha clínica, remitidas al Laboratorio de Referencia de la Dirección de Salud (DISA) II LIMA SUR sede Magdalena de los centros de Salud de la DISA II LIMA SUR durante los meses de Octubre 2014 al setiembre del 2015.

### 3.2.2 Criterios de Inclusión

- Cultivos positivos provenientes de pacientes de 15 a 65 años de edad con diagnóstico clínico TB/VIH según ficha clínica.
- Cultivos positivos provenientes de pacientes de 15 a 65 años de edad con diagnóstico clínico de TB MDR según ficha clínica.

### 3.2.2 Criterios de Exclusión

- Cultivos positivos con diagnóstico VIH/TB y TB MDR contaminados.
- Cultivos positivos con diagnóstico VIH/TB y TB MDR con pocas colonias.
- Cultivos positivos con diagnóstico VIH/TB y TB MDR mayor de 40 días.

### 3.3 Muestra

El presente estudio fue realizado con dos tipos de muestras: 66 cultivos positivos de pacientes con diagnóstico VIH/TB y 100 cultivos TB MDR.

### 3.4 Muestreo.

La selección de cultivos VIH/TB se llevó a cabo por conveniencia, se consideró todos los cultivos positivos remitidos al laboratorio de micobacterias durante el periodo de 12 meses (Octubre 2014 – Setiembre 2015).

La selección de cultivos TB MDR se llevó a cabo de manera aleatoria por un muestreo probabilístico, cogiendo 8 cultivos aproximadamente por mes, en un periodo de 12 meses (Octubre 2014 – Setiembre 2015).

### 3.5 Operacionalización de Variables.

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICION	FORMA DE REGISTRO
<b>Tuberculosis (TB)</b>	Enfermedad infecciosa generalmente crónica, causada por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <sup>40</sup>	Enfermedad causada por <i>M. Tuberculosis</i> por baciloscopia y/o cultivo.	Nominal	Si: Presenta tuberculosis. No: Presenta tuberculosis.

<b>Inmunodepresión (VIH/TB)</b>	El estado anormal del sistema inmunológico, que se traduce en disminución en la resistencia a infecciones <sup>41</sup>	Contactos y pacientes con TB-MDR cuyas muestras de esputo pudieran provenir de estas personas enfermas con el virus de la inmunodeficiencia humana.	Nominal	Si: Presenta VIH/TB No: Presenta VIH/TB
<b>Multidrogo resistencia (MDR)</b>	Al concepto microbiológico en el cual un microorganismo del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> aislado en un enfermo, no es susceptible a la acción de uno o varios fármacos antituberculosos <sup>40</sup>	Resistencia a una o más drogas antituberculosas llamándosele multidrogo resistente cuando se presente resistencia simultáneamente a Isoniacida y Rifampicina.	Nominal	Si: Presenta resistencia a Isoniacida y Rifampicina No: Presenta resistencia a Isoniacida y Rifampicina
<b>VARIABLE</b>	<b>DEFINICION CONCEPTUAL</b>	<b>DEFINICION OPERACIONAL</b>	<b>ESCALA DE MEDICION</b>	<b>FORMA DE REGISTRO</b>

<p><b>Inmunocromatografía Capilia®TB</b></p>	<p>Al concepto inmunológica que permite visualizar la reacción antígeno-anticuerpo por la acumulación de partículas coloidales del conjugado en zonas específicas del papel de nitrocelulosa donde se fijan previamente anticuerpos de captura<sup>18, 36</sup></p>	<p>Esta proteína denominada MPB64, es secretada fuera de las células durante el cultivo del complejo M tuberculosis.</p>	<p>Nominal</p>	<p>Positivo: <i>Mycobacterium tuberculosis</i></p> <p>Negativo: Micobacterias no tuberculosis.</p>
<p><b>Pruebas bioquímicas (Niacina y Nitrato)</b></p>	<p>Reacciones de oxidación-reducción que ocurre durante la síntesis metabólica en todas las micobacterias. Las micobacterias difieren en su capacidad para reducir los nitratos a nitritos mediante la presencia de una enzima nitrato reductasa</p>	<p>Identificación y la caracterización de las distintas especies de grupo de micobacterias</p>	<p>Nominal</p>	<p>Positivo: <i>Mycobacterium Tuberculosis</i></p> <p>Negativo: Micobacterias no tuberculosis</p>

### 3.6 Procedimientos y Técnicas

Para la detección de *M. tuberculosis* se llevó a cabo mediante el subcultivos de las micobacterias en medio L-J para realizar la descripción de características fenotípicas, pruebas bioquímicas (niacina y nitrato) como prueba de referencia y la prueba Inmunocromatográfica Capilia® TB en evaluación. Las dos pruebas se llevaron a cabo de manera ciega y simultáneamente. El subcultivo se realizó en medio LJ a partir de las cepas de micobacterias de medio LJ o Ogawa procesadas en una cabina de bioseguridad clase II tipo A-2 (anexo 1).

Se extrajo las colonias de las cepas en estudio con una espátula cogiendo el mayor número posible, estas se colocaron en la pared interna del tubo de 20 x 150 mm estéril con tapón de algodón, el cual contenía 5 mL de agua destilada estéril, luego se procedió a triturar las colonias con ayuda de una bagueta esmerilada estéril hasta lograr homogenizarlas y así obtener una suspensión bacilar homogénea, se dejó reposar la suspensión por unos minutos hasta sedimentar. Se tomó el sobrenadante y se ajustó la turbidez de la suspensión bacilar comparando con el patrón de turbidez de la escala Mc Farland N°1<sup>38</sup>.

La dilución se realizó al décimo en tubos de 20 x 150 mm que contienen 9 mL de agua destilada estéril y 1 mL de la suspensión bacilar hasta  $10^{-2}$ <sup>38</sup>.

De la dilución  $10^{-2}$  se sembró 0,2 mL a cada uno de los tubos con medio L-J por cuadruplicado. Una vez realizadas las siembras, se tomó cada tubo por sus extremos manteniéndolo en posición horizontal y haciéndolo rotar suavemente para que la suspensión sembrada se distribuya sobre toda la superficie del medio L-J.

Los tubos se colocaron en una bandeja de metal de fondo inclinado para mantenerlos en posición horizontal, luego se llevó a incubar a 37 °C de 21 a 28 días.

Los tubos que se utilizaron para el medio del cultivo serán con tapa rosca, las cuales se mantendrán semicerradas durante las primeras 48 horas, hasta que se evapore la parte líquida del cultivo, después de la cual se ajustaran fuertemente para su adecuado desarrollo<sup>38</sup>.

Durante el tiempo de incubación del subcultivo, se observaron y se describieron las siguientes características fenotípicas de las micobacterias para diferenciación básica de MTB de las MNT.

- Características morfológicas de las colonias: crecimiento eugónico (colonias grandes, cremosas, rugosas con aspecto de coliflor propias de *M. tuberculosis*).
- Velocidad de desarrollo (de crecimiento rápido antes de los 5 a 7 días, ejemplo algunas MNT, y colonias de crecimiento lento después de tres semanas, *M. tuberculosis*)
- Presencia de pigmento (fotocromógenas colonias con pigmentos amarillos, escotocromógenas con pigmentos en la oscuridad y en la luz).

La identificación certera de *M. tuberculosis* se llevó a cabo con las pruebas bioquímicas (niacina y nitrato) según los procedimientos establecidos en el Manual de Microbiología de la OPS/OMS y el Manual de KENT PT, KUBICA GP. Public health mycobacteriology. A guide for the level III Laboratory *Center for Disease Control*. Atlanta. GA. 1985. Además por procedimientos y experiencias establecidas en el Documento Técnico de Procedimientos en Bacteriología del Instituto Nacional de Salud (anexo 3).

Para la prueba niacina se utilizó cultivo joven antes de los 30 días a los cuales se agregaron 2mL de agua destilada estéril caliente a la cepa con abundante colonias para liberar la niacina presente en el medio, se dejó las cepas en una bandeja inclinada por 15 minutos, transcurrido el tiempo con la ayuda de una pipeta estéril se retiró 1mL del líquido y se transfirió a tubos estériles previamente codificados. Finalmente se agregó 0.5 mL de bromuro de cianógeno y 0.5 mL anilina y/o bencidina. Evidenciándose la reacción positiva para *M. tuberculosis* por el cambio de color de transparente a amarillo si se utilizó anilina y rojo purpura si se utilizó bencina.

Para la prueba nitrato se utilizó cultivo joven de 21 días, se transfirió con una espátula 10 mg aproximadamente de masa bacilar y se homogenizó en un tubo que contiene 2mL solución acuosa de  $\text{NaNO}_3$  (0.01M) como sustrato, se dejó en estufa a 37°C por dos horas y finalmente se reveló la reacción de óxido-reducción agregando 10mg aproximadamente del reactivo Lampe compuesto por los siguientes reactivos: una parte de ácido sulfanílico, una parte de N-(1naftil) etilendiamina, diclorhidrato y diez partes de ácido tartárico. La coloración grosella indicará la

actividad de nitrato reductasa con formación de nitritos en el medio, lo que indica prueba positiva para *M. tuberculosis*.

La prueba Inmuncromatográfica Capilia® TB se realizó según los procedimientos establecidos en el instructivo del kit Capilia® TB.

Para ello se dispense 200 µL de buffer de suspensión (solución salina fosfato que viene incorporado al Kit) en un tubo de microcentrífuga de 2 mL. Se cogió 10mg aproximadamente de masa bacteriana con ayuda de una espátula estéril y se mezcló con el buffer salina fosfato, se agito en vórtex por 1minuto y se dejó reposar la suspensión bacteriana por 15 minutos con la finalidad que se libere el antígeno MPB64 en la suspensión. Y finalmente con mucho cuidado con una micropipeta se colocó 100 µL del sobrenadante en el área de pocillo de la placa (kit).

La prueba Capilia® TB considerado positivo para *M. tuberculosis*, cuando se verifico dos líneas rojo-púrpura en la zona del test (T) y en la zona de control © de la placa. La prueba Capilia® TB considerado negativo para *M. tuberculosis*, cuando se verifico una sola línea rojo-púrpura en la zona de control ©.

La evaluación diagnóstico de la prueba Capilia® TB también se realizó con cepas de referencia *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> como control positivo y cepas de MNT (*M. zulgai* y *M. flavescences*) como control negativo, identificadas por pruebas bioquímicas en el laboratorio de Micobacterias del INS (anexo 4).

La identificación de especies de las MNT se llevó a cabo de cultivos que resultaron negativos para *M. tuberculosis* por pruebas bioquímicas: niacina y nitrato (-) y la prueba Capilia® TB (-) en muestras VIH/TB.

Se realizó una serie de pruebas bioquímicas tales como: prueba de hidrólisis de tween, prueba de captación de hierro, la prueba de ureasa, la prueba de arysulfatasa, la prueba de β-glucosidasa, tolerancia al NaCl. Pruebas que se procesaron según las recomendaciones descritas en el manual de identificación de Micobacterias de la OPS/OMS y el Manual de Kent PT, Kúbica GP. Public health



mycobacteriology. A guide for the level III Laboratory Center for Disease Control. Atlanta. GA. 1985. ver procedimientos de las diferentes pruebas en (anexo 3 y 5).

### **3.7 Plan de Análisis de Datos**

Se generaron una base de datos con la ayuda del programa Excel versión 2013 y los datos se ingresaron al programa estadístico STATA vr. 14 para determinar los cálculos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos. Para valorar la medida de concordancia se empleó la prueba Índice de Kappa.

## **CAPITULO IV DISCUSION DE RESULTADOS**

### **4.1 RESULTADOS**

**Tabla 1.** Identificación de *M. tuberculosis* con la prueba bioquímica de referencia según tipo de muestra.

Tipo de muestra	*Resultados de la prueba Bioquímica			
	Positivos	%	Negativos	%
Cepa VIH/TB (66)	60	38	6	75
Cepa TBMDR (100)	98	62	2	25
<b>Total (166)</b>	<b>158</b>	<b>100</b>	<b>8</b>	<b>100</b>

\* Prueba de referencia: Prueba Bioquímica (niacina y nitrato). Manual de Identificación de Micobacterias de la OPS/ OMS y kública CDC.

Positivos: *M. tuberculosis* Negativos: MNT

**Tabla 2.** Identificación de *M. tuberculosis* con el método Capilia® TB según tipo de muestra.

Tipo de muestra	*Resultados de la prueba Capilia® TB			
	Positivos	%	Negativos	%
Cepa VIH/TB (66)	60	37,5	6	100
Cepa TBMDR (100)	100	62,5	0	0
<b>Total (166)</b>	<b>160</b>	<b>100</b>	<b>6</b>	<b>100</b>

\* Instructivo de uso Capilia® TB

Positivos: *M. tuberculosis*

Negativos: MNT

**Tabla 3.** Resultados de evaluación diagnóstica de la prueba Inmunocromatográfica Capilia® TB para la identificación de *M. tuberculosis* en cultivos positivos de pacientes

con diagnóstico VIH/Tuberculosis y cultivos positivos de pacientes con Tuberculosis Multidrogorresistente.2015.

<sup>a</sup> *M. tuberculosis*

<sup>b</sup> Micobacteria no tuberculosa

Pruebas Bioquímicas	Capilia® TB		Eficiencia <sup>c</sup> de la prueba Capilia® TB			
	MTB <sup>a</sup>	MNT <sup>b</sup>	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
<b>MTB<sup>a</sup> (158)</b>	158	0	100	75	99	100
<b>MNT<sup>b</sup> (8)</b>	2	6				
<b>Total (166)</b>	<b>160</b>	<b>6</b>				

<sup>c</sup> sensibilidad, Especificidad, VPP valor predictivo positivo, VPN valor predictivo negativo.

**Tabla 4.** Resultados de concordancia entre la prueba Capilia® TB y las pruebas bioquímicas en la identificación de *M. tuberculosis* en cultivos positivos VIH/TB y TB MDR.

Valor	Error estándar
0,851	0,146

Valoración del Índice de Kappa según LANDIS y KOCH	
Kappa	Grado de acuerdo
< 0,00	sin acuerdo
>0,00 - 0,20	Insignificante
0,21 - 0,40	Discreto
>0,41 - 0,60	Moderado
0,61 - 0,80	Sustancial
<b>0,81 - 1,00</b>	<b>casi perfecto</b>

**Tabla 5.** Correlación entre la prueba Capilia® TB y las pruebas bioquímicas en la identificación de *M. tuberculosis* en cultivos positivos VIH/TB y TB MDR.

		*Prueba de referencia		Total
		Positivo	negativo	
**Capilia® TB	positivo	158	2	160
	negativo	0	6	6
Total		158	8	<b>166</b>

\* Prueba de referencia: Pruebas Bioquímicas (niacina y nitrato)

\*\* Prueba en evaluación: Capilia® TB

**Tabla 6.** Identificación de Micobacterias No Tuberculosas identificadas por pruebas bioquímicas en cepas VIH/TB.

MICOBACTERIAS	Nº	%
<i>M. tuberculosis</i>	60	91
<i>Complejo M.avium-intracellulare</i>	2	3
<i>Complejo M. terrae</i>	2	3
<i>M. zulgai</i>	2	3
<b>Total</b>	<b>66</b>	<b>100</b>

## 4.2 DISCUSION DE RESULTADOS

En el presente trabajo de investigación se evaluó la prueba Inmunocromatográfica Capilia® TB para una rápida identificación y consecuentemente la diferenciación de *M. tuberculosis* de las micobacterias no tuberculosas (MNT) comparado con pruebas bioquímicas (nitrato y niacina) como prueba de referencia.

Convencionalmente la identificación tanto de *M. tuberculosis* y de las MNT se llevan a cabo mediante pruebas que permiten detectar características fenotípicas y bioquímicas, estas pruebas son engorrosos y peligrosos, sin embargo es importante disponer de un método de diagnóstico sencillo, rápido y eficaz para la identificación de *M. tuberculosis* a partir de cultivos, que elimina riesgos en el uso de reactivos de alta toxicidad.

Capilia® TB es una prueba inmunocromatográfica de flujo lateral que usa anticuerpos monoclonales para detectar la proteína denominada MPB64, un antígeno específico del complejo *M. tuberculosis*. Los resultados son obtenidos en 30 minutos en comparación a las pruebas bioquímicas niacina y nitrato que demoran 2 días para la identificación de *M. tuberculosis*.

Las tablas 1 y 2 presentan los resultados de identificación de *M. tuberculosis* por la positividad a las pruebas Bioquímicas (niacina y nitrato) y Capilia® TB respectivamente y a la vez la diferenciación de las micobacterias no tuberculosas (MNT) por la negatividad de los mismos con 166 cultivos positivos totales (66 VIH/TB y 100 TB MDR). Datos a partir del cual se obtuvieron valores de 100% de sensibilidad, 75% de especificidad, 99% de valor predictivo positivo y 100% de valor predictivo negativo (tabla 3). Resultados muy parecidos determinados por diferentes investigadores, como el equipo de Hilleman D. 2009 en Alemania determinó 92.4% de sensibilidad y 100% de especificidad con 172 muestras clínicas positivas a micobacterias<sup>9</sup>. Al igual que en un reciente estudio realizado por el equipo de Ngamlert K, 2012 en Tailandia, evaluó la capacidad de la prueba Capilia TB con 247 cultivos determinando 97% de sensibilidad y 100% de especificidad comparado con la prueba bioquímica como referencia<sup>19</sup>. Por último, el equipo de Shen G-H en 2009 en Taiwán, determinó si la prueba Capilia TB podía reemplazar al sistema de detección molecular de sondas de ácidos nucleicos BD ProbeTec (CTB) en la

identificación del complejo *M. tuberculosis* en 233 cultivos líquidos (MGIT) en sistema BÁCTEC 960 positivos para micobacterias, obteniendo cifras de 96,9% de sensibilidad y 99.4% de especificidad<sup>20</sup>. Por lo que todos los resultados de evaluación de la prueba Capilia TB sobrepasan valores mayores de 90%.

El equipo de Abe Ch. 2009 y Hasegawa N. 2009, reportaron alta especificidad para la prueba Inmunocromatográfica, en los que evaluaron dicha prueba con cultivos de referencia positivos para *M. tuberculosis* determinándose una fuerte reacción específica para *M. tuberculosis*, En nuestro estudio la especificidad de la prueba Capilia® TB se probó con cepas cromógenas MNT con resultado negativo.

La tabla 4, muestra el valor de concordancia (85%) entre la prueba bioquímica y la prueba Capilia TB, los cuales en la interpretación de la medida de concordancia la prueba es casi perfecta según la valoración del Índice de Kappa por Landis y Koch.

La tabla 5, presenta la correlación entre las dos pruebas, para la identificación de *M. tuberculosis* obteniéndose valores de verdaderos positivos (158), verdaderos negativos (6) y (2) falso negativo para la prueba de referencia bioquímica (nitrato -), lo cual fue considerado como falso negativo y verdadero positivo para la nueva prueba en evaluación Capilia TB, debido al resultado de una tercera prueba, la prueba molecular de Reacción en Cadena de Polimerasa (Heminested PCR), que se utilizó para definir con certeza si era o no *M. tuberculosis*, el mismo que nos permitió salir de duda ya que dicha prueba identificó al cultivo como *M. tuberculosis*.

Estas discrepancias también han sido encontradas por otros autores, los cuales lo atribuyen a la presencia de más de una especie micobacterianas en el cultivo original o a mutaciones en genes específicas responsables de variar las rutas metabólicas. Por tal motivo se requiere evaluar nuevos métodos, ya que los convencionales se apoyan en características fenotípicas de las micobacterias, un parámetro susceptible de variar en algunos casos, lo que pudiera conducir a un diagnóstico erróneo de las mismas<sup>23</sup>.

La infección mixta ocurre con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos con el VIH que por lo general son difícil de diagnosticar por métodos convencionales<sup>18</sup>, sin embargo en nuestro estudio se obtuvo una posible infección mixta en un cultivo que no fue VIH/TB, sino solamente en una muestra de un paciente con resistencia a drogas TB MDR y/o una mutación específica del gen que codifica la proteína MPB-64. De acuerdo a estudios realizados por Abe et al., 2009; Hasegawa N. 2009, Ngamlert K. 2012 la prueba Inmunocromatográfica Capilia TB identifica al complejo *M. tuberculosis* a partir de cultivos mixtos con ventaja significativa que posteriormente serviría para llevar a cabo una correcta prueba de susceptibilidad <sup>18, 10, 19</sup>.

El tratamiento antituberculosis no ejerció efecto alguno en la producción del antígeno MPB64, según varios autores Capilia® TB es una buena herramienta de diagnóstico en comparación a pruebas moleculares como las sondas de ácido nucleicos (CTB) que en muchos casos dan resultados falsos negativos por presencia de inhibidores o nucleasas que segregan al medio estos bacilos después de recibir tratamiento antituberculosis, mientras la prueba Capilia® TB no presenta este tipo de problema porque permite la identificación de un antígeno específico MPB64<sup>11</sup>. Asimismo se trabajó en medios de cultivos sólidos de L-J por la disponibilidad y a la vez permitió una mejor recuperación de cepas y sobretodo evitar resultados falsos negativos por poca carga microbiana como lo fue demostrado en un estudio realizado por el equipo de Hilleman D. 2009, donde 9 cultivos positivos en medio líquido resultaron inicialmente negativos para Capilia® TB, y que al ser nuevamente evaluados a partir de cultivo en medio sólidos L-J, 6 de 9 cultivos resultaron positivos, a excepción de 3 cultivos que presentaron mutaciones en el gen que codifica dicha proteína MPB64<sup>9</sup>.

En la tabla 6, se presentan la identificación de las MNT que fueron identificadas con un grupo de pruebas bioquímicas y enzimáticas en cultivos de pacientes con coinfección VIH/TB obteniéndose como resultado: complejo *M. avium-intracellulare*, micobacteria que pertenece al grupo no cromógeno de crecimiento lento, colonias generalmente no cromógenas o debilmente pigmentadas. Datos que coinciden con diferentes reportes de frecuencia de micobacterias realizados en varios países de Latinoamérica y EE UU donde el complejo *M. avium* es la micobacteria encontrado

con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos con significancia clínica<sup>24</sup>. *M. terrae*, micobacteria que pertenece al grupo no cromógeno de crecimiento lento, colonias generalmente no cromógenas o débilmente pigmentadas. *M. zulgae*, micobacteria que pertenece al grupo escotocromógeno de crecimiento lento, colonias pigmentadas amarillentas o anaranjadas en la oscuridad.

Finalmente, la importancia de la prueba Capilia® TB está dada por la posibilidad de disponer de un método de identificación sencillo, rápido y eficaz para la identificación de *M. tuberculosis* a partir de cultivos, además elimina el riesgo que significa el uso de reactivos de alta toxicidad de método convencional bioquímica y consecuentemente este kit Capilia® TB es una buena opción para el uso rutinario en los diferentes laboratorios a nivel nacional.

#### **4.3 CONCLUSIONES**



- Se determinó la identificación de *M. tuberculosis* por el método Inmunocromatográfico Capilia® TB en cultivos positivos de pacientes con Diagnóstico VIH/TB y cultivos positivos de pacientes TB Multidrogorresistente determinándose valores: 100% de sensibilidad, 75% de especificidad, 99% de valor predictivo positivo y 100% de valor predictivo negativo.
- Se determinó un elevado valor de concordancia (85%) entre método de referencia pruebas bioquímicas (niacina y nitrato) y la prueba Inmunocromatográfica Capilia® TB para la identificación de *M. tuberculosis*, los cuales según valoración de medida de concordancia la prueba Capilia® TB es casi perfecta.
- Se identificó 3 micobacterias no tuberculosas (*Complejo M. avium-intracellulare*, *Complejo M. terrae* y *M. zulgai*) en cultivos de pacientes con VIH/TB por pruebas bioquímicas y enzimáticas, uno de los cuales el Complejo *M. avium- intracellulare* tiene significancia clínica en pacientes infectados con el VIH.

#### **4.4 RECOMENDACIONES**

- Realizar la identificación de *M. tuberculosis* con prueba Capilia® TB, a partir de cultivos líquidos con todas las medidas adecuadas de bioseguridad con la finalidad de ahorrar tiempo en la identificación de *M. tuberculosis*.
- Resultado discordante para la prueba Bioquímica (nitrato negativo), utilizado como prueba de referencia en el presente trabajo de investigación, se requiere evaluar

otras pruebas alternas en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias, siendo una de ellas de mayor disponibilidad, la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sondas de ácidos nucleicos altamente sensibles y específicos a partir de muestras clínicas para la identificación rápida de *M. tuberculosis*.

- Evaluar la prueba Capilia® TB con mayor cantidad de cultivos de micobacterias para descartar la posibilidad de encontrar cepas mutantes incapaces de producir la proteína específica del complejo *M. tuberculosis* denominado MPB-64, los cuales dan resultados falsos negativos como suelen encontrarse en diferentes países por diversos investigadores.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. WHO. Tuberculosis report 2014: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf?ua=1)
2. Mendoza A, Iglesias D, Tuberculosis en pacientes con VIH/SIDA. Acta Med. Per. 2013; 25 (4).
3. Matías B, Jalles A, Justa R, Barbosa T. Factors Related to HIV/Tuberculosis Coinfection in a Brazilian Referent Hospital. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2010; 12 (4):281-286.

4. Lemus D. Métodos rápidos para la detección de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis para opción al Grado de Científico de Doctor En Ciencias de la Salud. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. Cuba 2010.
5. Del Castillo H, Mendoza A, Saravia J, Somocurcio J. Análisis de la situación actual y propuesta de lineamientos técnicos para el control y prevención de la tuberculosis resistentes en el Perú, 2011. Informe final.
6. MINSA. Evaluación de la Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis Año 2013
7. Construyendo Alianzas Estratégicas para detener la Tuberculosis. Perú MINSA, 2013.
8. Weel CD, Cegielski JP, Nelson Ij, Laserson KF, Holtz TH, Finlay A, Castro KG, Weyer K. HIV infection and multidrug resistant tuberculosis- the perfect storm. J. Infect. Dis 2010 Aug 15; 196 Suppl 1: S86-107.
9. Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. Application of the Capilia TB assay for culture confirmation of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2009; 9(12):1409–1411.
10. Hasegawa N, Miura T, Ishii K, Yamaguchi K, Linder T., Merritt S, Matthews J. and Sidiqi S. New Simple and Rapid Test for Culture Confirmation of Mycobacterium tuberculosis Complex: a Multicenter Study. Journal of Clinical Microbiology. 2009; 908-912.
11. Wang J-Y, Lee L-N., Lai H-C., Hsu H-L., Jan I-S., Yu C-J., Hsueh P—R, Yang PC. Performance assessment of the Capilia TB assay and the BD ProbeTec ET system for rapid culture confirmation of Mycobacterium tuberculosis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2010; 59(4):395-9.

12. Yzquierdo S., Mederos L., Díaz A., Echemendía M., Montoro E. 2010. Aplicación de PCR-RFLP en el diagnóstico de micobacterias no tuberculosas Rev Chil Infect; 24 (5): 391-39
13. Organización Panamericana de la Salud (OPS) 2013, Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica parte II Cultivo.
14. Dorronsoro I, Torroba L. Microbiología de la Tuberculosis, Na. Sis. San. Navar. 2009; 30 (supl. 2): 67-84.
15. Godoy M. Orozco L, Hernández C, Da Mata O, De Waard J, González S. identificación de micobacterias no tuberculosas: comparación de métodos bioquímica y molecular. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2011; 28: 96-104.
16. Moran M, Acevedes D, Peña P. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del Noroccidente de México. Rev. Panam. Salud Pública. 2011; vol. 7 N° 6 Washinton.
17. Yamaguchi R, Matsuo K, Yamazaki A, et al. Cloning and characterization of the gene for immunogenic protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun; 2009; 57: 283–288.
18. Abe CH, Hirano H. and Tomiyama T. Simple and Rapid Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Immunochromatographic Assay Using Anti-MPB64 Monoclonal Antibodies Journal of Clinical Microbiology, 2009, Nov. p. 3693-3697 Vol. 37, N°11.
19. Ngamlert K, Sinthuwattanawibool Ch, Kimberly D, McCarthy, et al., Diagnostic performance and costs of Capilia TB for *Mycobacterium tuberculosis* complex identification from broth-based culture in Bangkok, Thailand. Tropical Medicine and International Health 2012; volume 14 N° 7; 748–753.

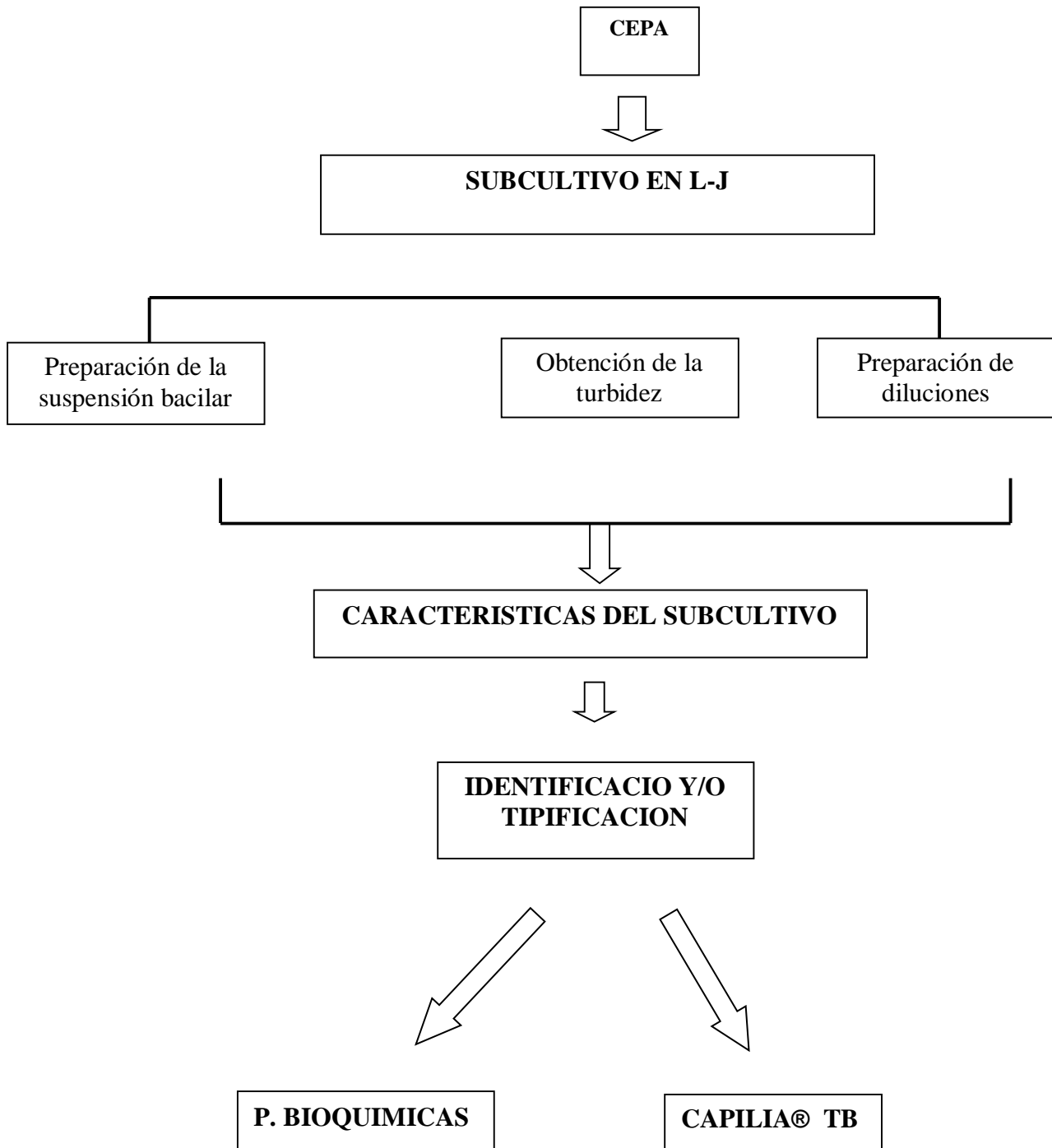
20. G-H, Shen, C-H, Chen, C-H, Hung. et al., Combining the Capilia TB assay with smear morphology for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2012; 13(3):371–376.
21. Cortés E. Descripción de técnicas fenotípicas y moleculares para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y micobacterias atípicas en el laboratorio clínico. Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bacteriología. Colombia 2010.
22. Norma Técnica de Salud para el Control de la Tuberculosis. 2012; NST N° 041 /MINSA/ DGSP-V.01, 2012.
23. Castro C, Puerto G, García L, Orejuela L. Identificación molecular de micobacterias no tuberculosas mediante el análisis de los patrones de restricción, Colombia 2005-2009. *Revista del Instituto Nacional de Salud, Biomédica* 2010; (27), 439-446.
24. Mederos L, Frantz J, Perovani A, Sardiñas M, Hilario E. Identificación de micobacterias no tuberculosas en pacientes VIH/SIDA por métodos convencionales y de fracciones de ácidos micólicos. 2009. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* v. 27 n. 1 Caracas.
25. Said-Fernandez S, Becerril-Montes P, Molina- Salinas. Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes. *Enf Emerg* 2010; 7(1): 15-16.
26. Pérez J, Sáenz P, Hernández-Cabrera M, Ángel-Moreno A. Situación actual y perspectivas clínicas de la Tuberculosis. Problemas terapéuticos. *Enf Emerg*; 2009; 7(1):6-11.
27. OMS/ Tuberculosis 2013. Nota descriptiva OMS N° 104.

28. Cabrera S, Medina J, Salaverry M, Libran H, González E. Dificultad en el diagnóstico de la tuberculosis en pacientes infectados con por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y variables que determinan el inicio de un tratamiento empírico antituberculoso. *Rev. Med. Urug.* 2011; 23: 164-172.
29. Gutiérrez R, Gotuzzo E. Co-infección VIH y Tuberculosis. Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt. 2012.
30. Ugarte-Gil C, Ponce M, Moore D. Pruebas de sensibilidad para *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Med. Per.* 25(3) 2010.
31. Bonilla C. Tuberculosis en el Perú. *Acta Med. Per.* 25 (3) 2011.
32. Koneman/Allen/ Dowell/ Janda/ Sommers/ Winn. *Diagnostico microbiológico* 2013, 4ta edición Editorial Medica Panamericana S.A. Argentina.
33. Clinical and Laboratory Standrs Institute 2009. *Susceptibility Testing Of Mycobacteria, Nocardia, and other Aerobic Actinomicetes; Approved Standard document M24-A Vol. 23 N° 18 Replaces M24-T2 Vol. 20 N° 26 NCCLS.*
34. Organización Panamericana de Salud OPS. *Manual de identificación de micobacterias.*
35. KENT PT, KUBICA GP. *Public health mycobacteriology. A guide for the level III Laboratory Center for Disease Control. Atlanta. GA. 1985.*
36. *Manual Técnico Capilia® TB. 2012. ver, 1.8 Pág. 1-11.*
37. Murcia G, Alvarado B, Diveles G, Prevalencia de micobacterias en pacientes VIH/SIDA en Bogotá. *Revista de Neumología* 2014.

38. Manual de identificación de micobacteria. Instituto Nacional de Salud. El laboratorio de salud pública frente a la emergencia de la tuberculosis resistente. Lima: INS; 2011 Perú. Documento Técnico N° 3.
39. Alcaide F. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Micobacterias 2009.
40. Norma Oficial Mexicana NOM-006SSA2-1993, para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud, modificaciones. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el martes 31 de Octubre del 2000.
41. Montes VE. Prevalencia de tuberculosis pulmonar en pacientes con VIH/SIDA y sus factores asociados. México Febrero 2010 pp.105.
42. Alarcón A. Reunión Técnica “Evaluación y a Análisis de Indicadores Epidemiológicos y Operacionales Año 2014 en Relación al Presupuesto por Resultados” VIH/TB en el Peru.
43. Brent, A. J., D.Mugo. 2014. Performance of the MGIT TBc identificación test and metanalysis of MPT64 assays for identification of the Mycobacterium tuberculosis complex in liquid culture. J. Clin. Microbiol. 49:4343 -4346.
44. BD MGIT™ TBc Test de Identificación.  
[http://www.bd.com/contentmanager/b\\_article.asp?Item\\_ID=24199&ContentType\\_ID=2&BusinessCode=20073&d=home&s=uk&dTitle=BD+-+UK%2FIreland&dc=uk&dcTitle=BD+-+UK%2FIreland](http://www.bd.com/contentmanager/b_article.asp?Item_ID=24199&ContentType_ID=2&BusinessCode=20073&d=home&s=uk&dTitle=BD+-+UK%2FIreland&dc=uk&dcTitle=BD+-+UK%2FIreland)

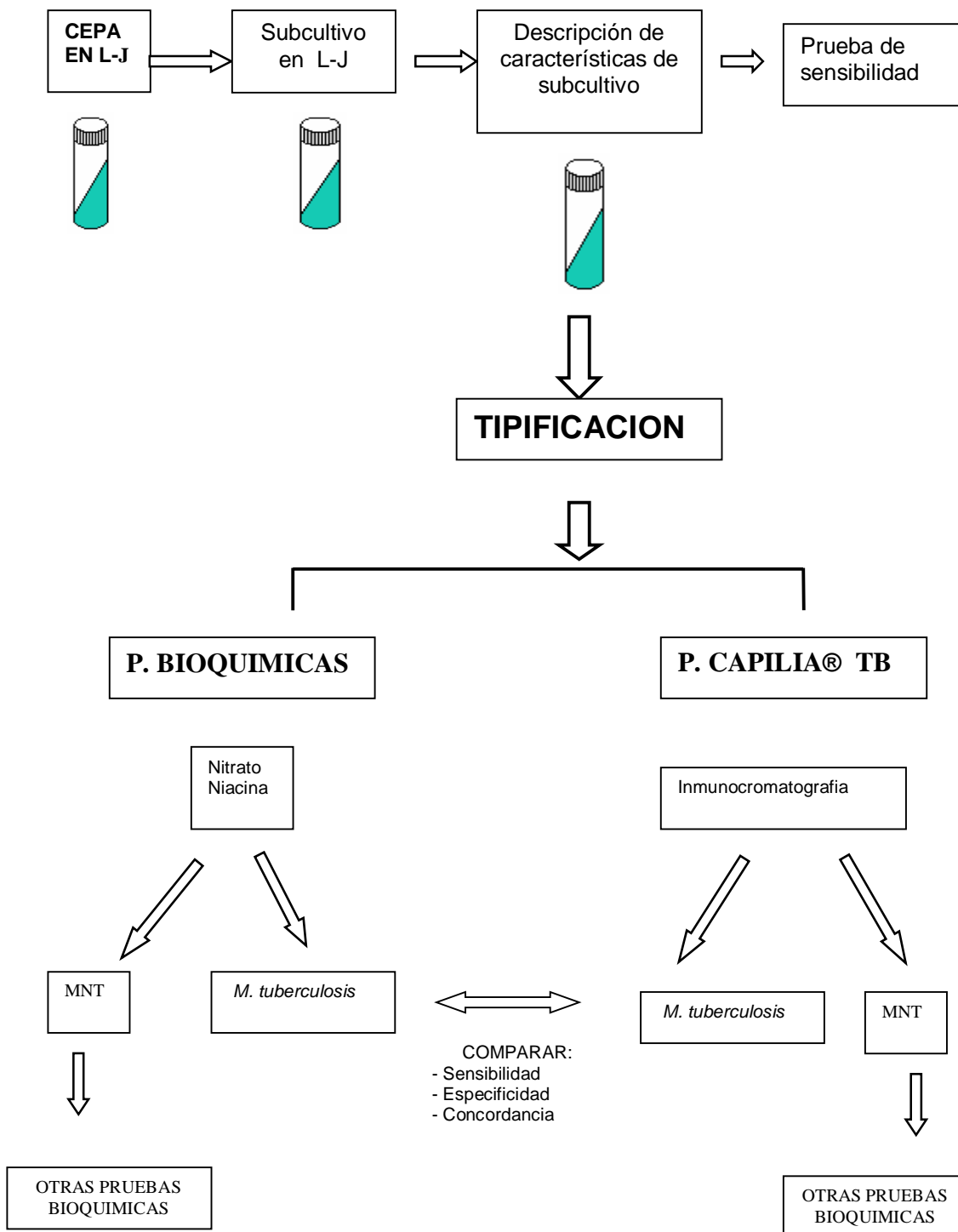
## ANEXOS

## ANEXO 1. FLUJOGRAMA GENERAL DE DIFERENCIACIÓN DE MICOBACTERIAS.

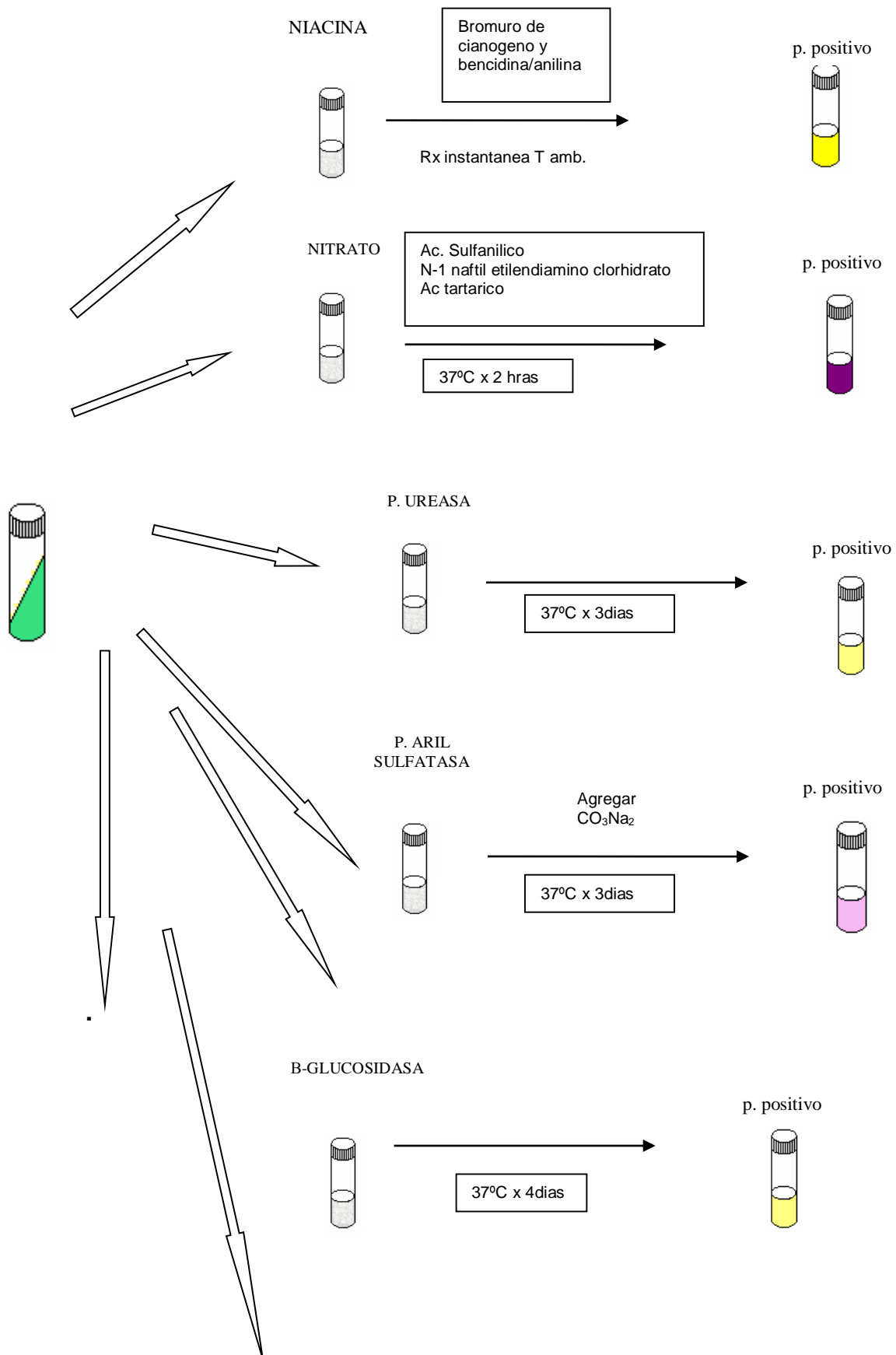


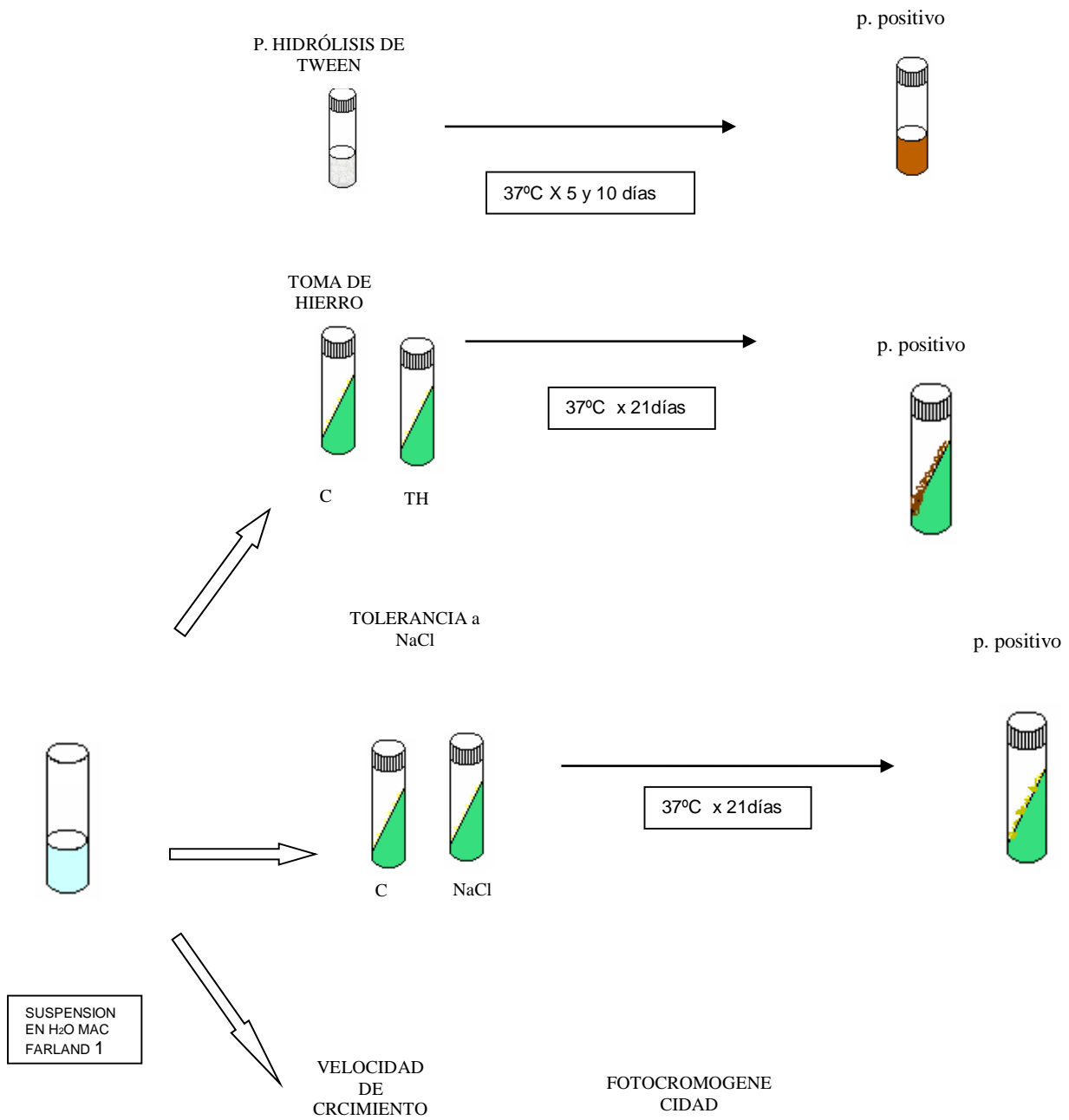


**ANEXO 2 FLUJOGRAMA GENERAL DE IDENTIFICACIÓN DE *M. TUBERCULOSIS*.**

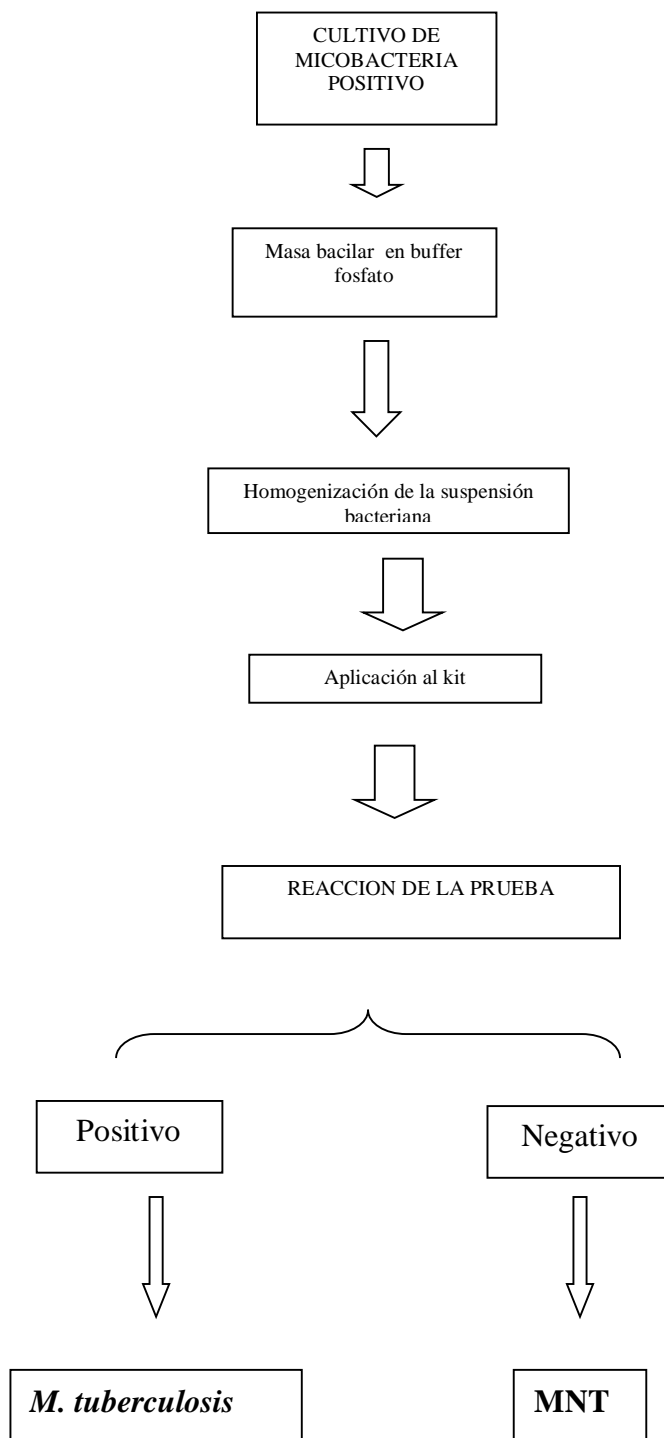


### ANEXO 3: FLUJOGRAMA DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN DE *M. TUBERCULOSIS* Y MNT.





**ANEXO 4 FLUJOGRAMA DE LA PRUEBA CAPILIA® TB PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *M. TUBERCULOSIS*.**



## **Anexo 5. PROCEDIMIENTOS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y ENZIMÁTICAS PARA MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS**

### **PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE TWEEN**

#### **Reactivos**

- Tween 80
- Rojo Neutro
- Solución reguladora de fosfato M/15, pH 7

#### **Preparación del reactivo**

- Disolver 0.5 mL de Tween 80 y 2.0 mg de rojo neutro en 100 mL de solución reguladora.
- Controlar el pH que no debe ser menos de 7.0 y el color amarillo ambar.
- Distribuir en tubos 13 x 100 o 18 x 100 mm con tapa rosca (4 mL c/u).
- Autoclavar 15 minutos a 121°C.
- Conservar en refrigeración protegido de la luz, no más de 02 semanas.

#### **Ejecución del método**

- Suspender en el sustrato una asada de colonias de un cultivo joven en medio sólido.
- Incubar a 37°C sin contacto de la luz.
- Examinar a los 5 y 10 días.
- Incubar un tubo control sin inóculo.

#### **Lectura e interpretación de resultados**

- Observar los tubos, comparativamente con el control ámbar
- Se considera positivo (+) un cambio de color a rosa salmón
- Tomar nota de la fecha en que se observa ese cambio y seguir incubando hasta completar los 10 días para confirmar, el color puede intensificarse a rosado más intenso y hasta rojo oscuro.

Nota: Los tubos no deben ser agitados antes de la lectura. Algunas células pueden tomar el colorante, lo que provoca un color rosado en el sedimento del tubo, mientras que el sobrenadante continúa ámbar, en este caso se reporta como negativo.

#### **Cepas de referencia para control de calidad.-**

- Utilizar un control (-) sin inóculo.

## **PRUEBA DE TOMA DE HIERRO**

### **Reactivos**

- Solución acuosa de citrato de hierro amoniacal al 4%. esterilizar en autoclave
- Agua destilada estéril
- Reactivos para la preparación de medios de cultivo L-J.

### **Ejecución del Método**

- Inocular 2 tubos de medios de Lowenstein-Jensen, cada uno con 0.1 mL de una suspensión bacilar de aproximadamente 1 mg/mL del cultivo en estudio.
- Colocar los tubos inclinados, difundiendo la siembra en toda la superficie del medio. Luego colocarlos verticalmente y añadir en el fondo de uno de ellos 1 mL de la solución de citrato de hierro amoniacal; en el otro tubo agregar 1 mL de agua destilada estéril.
- Incubar en posición vertical a 37°C.

### **Lectura e interpretación de resultados**

- De ser la reacción positiva aparece en el tubo con citrato, entre la primera y tercera semana de incubación, un color marrón que se va extendiendo a las colonias por encima del nivel del líquido. Se compara con el tubo control.

### **Cepas de referencia para control de calidad.-**

- Por cada corrida del cultivo en estudio se utiliza un tubo con medio Lowenstein-Jensen con inóculo más 1 mL de agua destilada estéril, es un control (-).

### **Control de calidad de la prueba**

- Se debe efectuar la prueba de Toma de Hierro siguiendo los procedimientos técnicos descritos, tomando en cuenta que para cada cultivo en estudio se agrega un tubo con medio Lowenstein-Jensen con 1 mL de agua destilada.

## **PRUEBA DE TOLERANCIA DE CLORURO DE SODIO**

### **Medio de cultivo de Lowenstein-Jensen y reactivos**

- Solución de cloruro de sodio al 5%
- Agua destilada
- Reactivos para preparación de medios de cultivo L-J.

### **Preparación de Medio de cultivo de Lowenstein-Jensen con CINA**

- Preparar el medio de cultivo de Lowenstein-Jensen de acuerdo al procedimiento (ver anexo 3).
- Antes de su coagulación del medio Lowenstein-Jensen, agregar la solución de cloruro de sodio para alcanzar una concentración final del 5%.
- Dispensar el medio en tubos de 20x125 o 20x150 mm. de acuerdo al procedimiento.
- Coagular el medio.

### **Ejecución del Método**

- Dispensar 3 a 5 mL de agua destilada estéril en tubos con tapón de algodón de 18 x 150 o 20 x 150 mm.
- Suspende una asada de colonias en las paredes del tubo con agua destilada, macerar muy suavemente hasta la homogeneidad de la suspensión
- Inocular la suspensión bacilar 0.1 mL en 02 tubos de Lowenstein- Jensen, un tubo con 5% de CINA y el otro tubo L-J sin cloruro.

### **Lectura e interpretación de resultados**

En el tubo control normalmente se obtendrá un desarrollo incontable de colonias. Si hay desarrollo de colonias en el tubo con CINA de más de 50 colonias se considerará que la cepa es Resistente o tolerante al CINA y si el desarrollo es menor de 50 colonias, que se considerará como Sensible.

### **Control de calidad de la prueba.-**

- Se debe efectuar la prueba de Toma de Hierro siguiendo los procedimientos técnicos descritos, tomando en cuenta que para cada cultivo en estudio se agrega un tubo con medio Lowenstein Jensen sin Cloruro de Sodio.

### **PRUEBA ARIL SULFATASA**

#### ***Reactivos y Medios***

- Fenofaleín bisulfato tripotásico
- Carbonato de sodio
- Medio Dubós

### **Preparación del sustrato**

- Disolver 2.6 g de Fenoftaleín bisulfato tripotásico (0.08 M) en 50 mL de agua destilada.
- Esterilizar por filtración, con filtro de membrana 0.22  $\mu$ .
- Mantener en refrigeración 2 - 8°C.

### **Preparación de del Medio de cultivo**

- Preparar 200 mL de medio líquido Dubós en 02 matraces
- Agregar a un matraz con medio Dubós 2.5 mL del sustrato para la prueba de 3 días
- Agregar al otro matraz con medio 7.5 mL del sustrato para la prueba de 2 semanas
- Distribuir los matraces de acuerdo a las pruebas de 3 días y 2 semanas en tubos de 13 x 100 o 18 x 100 con tapa rosca, 2 mL en cada tubo.

### **Preparación del Reactivo**

- Pesar 10.6 g de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  anhidro.
- Disolver en 100 mL de agua destilada estéril.
- Guardar la solución en ambiente fresco

### **Ejecución del método**

- Para cada cepa inocular en 2 tubos ( de 3 días y 2 semanas) 0.1 mL de la suspensión bacilar, que son colonias tomadas de un cultivo joven de medio L-J.
- Incubar a 37°C.
- A los 3 días, agregar en el tubo correspondiente 6 gotas de la solución de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ .
- A las 2 semanas hacer lo propio en el tubo restante.

### **Lectura e interpretación de resultados**

- Observar los tubos, si tornan a un color rojo o rosado indica como resultado positivo (+).
- Si los tubos se mantienen sin cambio de color, indica que es negativo (-).

Nota: Cuando el sustrato contiene fenoftaleína libre, el control no inoculado puede adquirir color rojo al agregarle la solución de carbonato. Por lo que se debe recristalizar el sustrato en etanol absoluto, en el cual la fenoftaleína es soluble, mientras que el fenoftaleín bisulfato tripotásico es insoluble.



### **Cepas de referencia para control de calidad.-**

- Control + de *M. fortuitum* o cepa adquiridos de los laboratorios Supranacionales de la OPS/OMS.
- Control (-): Un tubo con sustrato sin inóculo.

### **Control de calidad de la prueba.-**

Se debe efectuar la prueba de Arilsulfatasa siguiendo los procedimientos técnicos descritos, adicionando a los cultivos en estudio un tubo control (-) con sustrato sin inóculo. Y como control positivo la cepa de *M. fortuitum*.

## **PRUEBA DE UREASA**

### ***Reactivos y Medios***

- |                        |        |
|------------------------|--------|
| - Peptona              | 1g     |
| - Dextrosa             | 1g     |
| - Cloruro de sodio     | 5g     |
| - Fosfato monopotásico | 2g     |
| - Urea                 | 20g    |
| - Rojo fenol           | 0.012g |
| - Agua destilada       | 100 mL |

### **Preparación del Medio**

- Disolver la peptona, dextrosa, cloruro de sodio, fosfato monopotásico, urea, rojo fenol en 100 mL de agua destilada.
- Controlar el pH, que debe ser 6.8 – 6.9
- Esterilizar por filtración (con filtros de membrana 0.22)
- Diluir el preparado del medio 1:10 con agua destilada
- Distribuir en tubos estériles de 13 x 100 o 18 x 100 mm con tapa rosca.

### **Ejecución del método**

- Extraer colonias de un cultivo joven en medio L–J a los medios preparados.
- Al tomar las colonias macerar en las paredes del tubo con medio y homogenizar bien.
- Incubar 3 días a 37°C.

## **Lectura e interpretación de resultados**

- Después de los 3 días de incubación, si el cultivo vira a color rosado indica como resultado positivo (+).
- Si los tubos se mantienen sin cambio de color, indica que es negativo (-)

## **Control de calidad de la prueba.-**

- Se debe efectuar la prueba de ureasa siguiendo los procedimientos técnicos descritos, adicionando a los cultivos en estudio un tubo con el medio control (-) sin inóculo.

## **PRUEBA DE $\beta$ - GALACTOSIDASA.**

### ***Reactivos y Medios***

- Fosfato monopotásico 1.0 g
- Fosfato disódico 6.25 g
- Sulfato de Magnesio 0.6 g
- Citrato de sodio 1.5 g
- Asparagina 2.0 g
- Tween 80(Sol. Acuosa 10%) 5.0 mL

### **Preparación del Medio**

- Disolver los componentes, cada uno por separado en un volumen de 100 mL
- Mezclar bien y completar a un volumen de 1000 mL pH 7.2.
- Distribuir en frascos 100 mL en cada uno.
- Autoclavar 20 min. a 121°C.
- Preparar al 9% de fracción V de albúmina bovina en solución fisiológica. Esta solución calentar a 56°C por 30min. y esterilizar por filtración.
- Disolver en 100 mL del medio basal anteriormente descrito 100 mg del sustrato 2-nitrofenil  $\beta$  -D- galactopiranosido, agregándose luego 4 mL. de la solución albúmina.
- Esterilizar por filtración nuevamente.
- Distribuir en tubos estériles de 16 x 1250 con tapa rosca, 5 mL. en cada tubo.

### **Ejecución del método**

- Preparar la suspensión bacilar: Una asada de colonias jóvenes de un cultivo de L-J en 3 – 5 mL de agua destilada estéril, macerar en la pared del tubo, y homogenizar cuidadosamente.

- Inocular 0.5 mL de una suspensión bacilar (aprox. 1 mg/mL) en cada tubo con medio por muestra
- Incubar a 37°C de 4 a 6 semanas.

### Lectura e interpretación de resultados

- Después del tiempo de incubación establecido, verificar el viraje de coloración, si vira a un color amarillo se indica como positivo.
- Si los tubos se mantienen sin cambio de color, indica que es negativo (-)

**Nota:** Si se emplea el medio Dubos deshidratado de origen comercial, en lugar del descrito anteriormente, su color ligeramente amarillo puede interferir en las lecturas.

### Control de calidad de la prueba

- Se debe efectuar la prueba de  $\beta$ - Galactosidasa siguiendo los procedimientos técnicos descritos, adicionando a los cultivos en estudio un tubo con el medio control (-) sin inóculo.

## Anexo 6. Diferenciación básica de micobacterias mediante características fenotípicas.

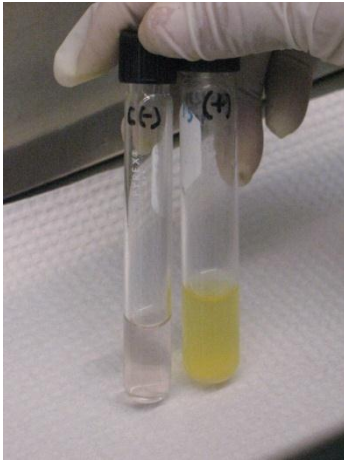
	Morfología de las colonias		Velocidad de crecimiento		Formación de pigmentos	
	Crec. Eugónico*	Crec. Disgónico**	Lento	rápido	si	No
CEPAS VIH/TB <b>(66)</b>	42	24	66	0	8	58
CEPAS TB MDR <b>(100)</b>	54	46	100	0	0	100

- Manual de procedimientos en Bacteriología de Tuberculosis. Norma Técnica Instituto Nacional de Salud.

- \* Crecimiento eugónico: Colonias con crecimiento profuso, son fáciles de separar de la superficie del medio, rugosas con aspecto de coliflor.
- \*\* Crecimiento disgónico: Colonias pequeñas, menores de 1mm de diámetro adheridas al medio.

## ANEXO 7. Fotos de pruebas bioquímicas y enzimáticas

PRUEBA DE NIACINA



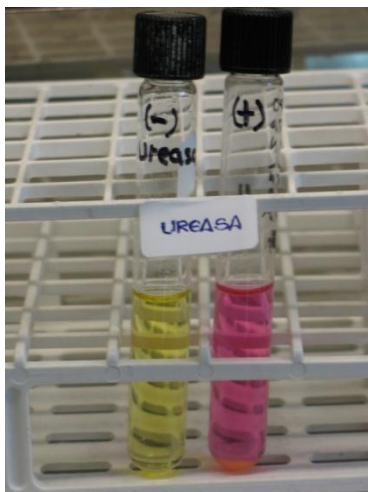
(-) (+)

PRUEBA DE NITRATO



(-) (+)

PRUEBA DE UREASA



(-) (+)

PRUEBA DE B-GLUCOSIDASA



(-) (+)

PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE TWEEN



(-) (+)

PRUEBA ARILSULFATASA



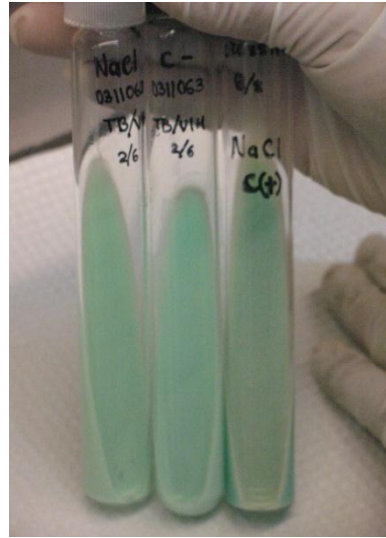
(-) (+)

TOMA DE HIERRO



(C) (-) (+)

TOLERANCIA AL NaCl



(C) (-) (+)

**ANEXO 8. Tabla de Resultados de pruebas bioquímicas de identificación DE *M tuberculosis* y MNT**

N <sup>o</sup>	Vel	Pig	Ni	NO <sub>3</sub>	HT		B-Glu	ClNa	TH	Ariil Sulfatasa		Ureasa	Resultados
					5d	10d				3dias	2 semanas		
1	L	-	-	+	-	-	+	-	-	+ -	+	-	Complejo <i>M. avium</i>
2	L	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	Complejo <i>M. térrea</i>
3	L	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Complejo <i>M. zulgae</i>

vel: velocidad de crecimiento

Pig: Pigmentacion

Ni: Niacina

NO<sub>3</sub>: Nitrato

HT: Hidrolisis de Tween

B-Glu: Beta glucosidasa

ClNa: Tolerancia a Cloruro de sodio

TH: Toma de Hierro

**MATRIZ DE CONSISTENCIA. Identificación de *Mycobacterium tuberculosis* por Inmunocromatografía Capilia®TB en cultivos de pacientes con diagnóstico VIH/Tuberculosis y Tuberculosis Multidrogorresistente Lima, 2015**

Problema	Objetivos	Variables	Metodología
<p><b>Principal</b> ¿Cómo identificar el <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por Inmunocromatografía Capilia® TB a partir de cultivos positivos de pacientes con diagnóstico VIH/Tuberculosis y TB MDR?</p> <p><b>Específico</b> ¿Cuál es la sensibilidad y especificidad, del método Inmunocromatográfico Capilia®TB frente a la prueba de referencia bioquímica (niacina y nitrato) para la identificación de <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>?</p> <p>¿Cuál es la concordancia entre la prueba Capilia®TB y la prueba bioquímica en la identificación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>?</p> <p>¿Cuáles son las Micobacterias No Tuberculosas (MNT) en cultivos VIH/TB con pruebas bioquímicas y enzimáticas?</p>	<p><b>Principal</b> Identificar el <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por Inmunocromatografía Capilia® TB a partir de cultivos positivos de pacientes con diagnóstico VIH/TB y TB MDR</p> <p><b>Específico</b> Evaluar la sensibilidad y especificidad, del método Inmunocromatográfico Capilia®TB frente a la prueba de referencia bioquímica (niacina y nitrato) para la identificación de <i>Mycobacterium. Tuberculosis</i></p> <p>Determinar la concordancia entre la prueba Capilia®TB y la prueba bioquímica en la identificación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i></p> <p>Identificar las Micobacterias No Tuberculosas (MNT) en cultivos VIH/TB con pruebas bioquímicas y enzimáticas.</p>	<p><b>Variables independientes:</b> VIH/Tuberculosis y Tuberculosis multidrogorresistente.</p> <p><b>Variables dependientes:</b> Prueba de Inmunocromatografía Capilia® TB. Pruebas bioquímicas (Niacina y Nitrato)</p>	<p><b>Diseño del Estudio</b> Estudio de tipo descriptivo transversal</p> <p><b>Población.</b> Conformada por los cultivos positivos a micobacterias de pacientes con diagnóstico VIH/TB y TB MDR según ficha clínica, durante los meses de Octubre 2014 al setiembre del 2015.</p> <p><b>Muestra</b> El presente estudio se realizara con dos tipos de muestras: 66 cultivos positivos de pacientes con diagnostico VIH/TB y 100 cultivos TB MDR.</p> <p><b>Muestreo</b> La selección de cultivos VIH/TB se llevara a cabo por conveniencia, se considerara todos los cultivos positivos. La selección de cultivos TB MDR se llevara a cabo de manera aleatoria por un muestreo probabilístico, cogiendo 8 cultivos aproximadamente por mes.</p>

