

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* Y ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO EN PACIENTES DEL INH “LEOPOLDO IZQUIETA PÉREZ”-QUITO

Fernández-Soto, P.¹⁻², Proaño-Pérez, F.¹⁻³, Fierro-Aguas, I.², Ron-Garrido, L.¹, Andrade, R.⁴, Flores, M.⁴, Benítez-Ortíz, W.¹⁻³

¹ Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), Universidad Central del Ecuador

² Escuela de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador

³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador

⁴ Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical (INH) “Leopoldo Izquieta Pérez”, Quito, Ecuador.

Resumen. La tuberculosis (TB) es una enfermedad re-emergente distribuida en todo el mundo. *Mycobacterium tuberculosis* es la especie responsable del mayor número de casos; sin embargo, especies conocidas como micobacterias “atípicas”, así como otras especies del complejo *M. tuberculosis*, especialmente *M. bovis* se encuentran también implicadas en el apareamiento de la enfermedad. El objetivo principal de este estudio fue determinar las especies del complejo *M. tuberculosis* que causan TB en los pacientes que acuden al INH “Leopoldo Izquieta Perez”-Quito. En el estudio participaron 104 pacientes, de los cuales 71 contribuyeron con muestras de esputo y 33 con muestras de orina. Para el aislamiento se utilizaron dos medios de cultivo selectivos Löwenstein-Jensen y Stonebrink, la identificación de especie se realizó por medio de pruebas bioquímicas (Niacina, Reducción de Nitratos, Ureasa, Pirazinamidasas, NaCl 5%, preferencia de Oxígeno y Catalasa pH 7 a 68°C). Como resultados se obtuvo el aislamiento de colonias de muestras de esputo de 15 pacientes y de muestras de orina de un paciente. De estos 16 pacientes con aislamiento positivo, *M. tuberculosis* fue encontrada en 13 de ellos, en 3 pacientes no se pudo identificar la especie aislada con las pruebas bioquímicas utilizadas. Como factores de riesgo se encontraron a las afeccio-

nes respiratorias como neumonía presentada en pacientes hospitalizados ($P=0.0128$), el padecimiento de diabetes ($P=0.0186$) y los síntomas respiratorios como tos productiva y/o tos con flema por más de 15 días ($P<0.001$). En conclusión, *M. tuberculosis* es la especie más prevalente pero no se descarta la posibilidad de encontrar a otras especies del complejo *M. tuberculosis*, por lo que se recomienda mantener una farmacovigilancia epidemiológica apropiada y el estudio de las especies implicadas, en un tiempo de investigación más prolongado.

Palabras claves: tuberculosis, complejo *Mycobacterium tuberculosis*, factor de riesgo

Introducción

La tuberculosis (TB), es una enfermedad infecciosa y crónica considerada como la causa principal de muerte en adultos por infecciones (Ryan & Ray, 2004). Es causada principalmente por *M. tuberculosis*, existiendo también un número desconocido de casos de TB causados por *M. bovis* (OPS, 2004; Cosivi *et al.*, 1998). Actualmente se han detectado casos de TB provocados por micobacterias “atípicas” o ambientales que generalmente atacan a individuos con una inmunidad deficiente (OPS, 2004). El nombre genérico de *Mycobacterium* fue propuesto por Lehmann y Neumann en 1896 basados en las pelliculas, similares a las de algunos mohos, producidas por estas bacterias cuando se desarrollaban en medios líquidos (Jawetz *et al.*, 2002).

La TB se caracteriza por la formación de una lesión conocida como tubérculo, que se forma como resultado de la interacción entre el agente patógeno y la respuesta inmunológica celular del huésped. Las lesiones pueden localizarse en un solo órgano o en varios provocando diseminación generalizada. La TB es reconocida desde la antigüedad como una enfermedad endémica, que aparece citada en los manuscritos de las primeras civilizaciones. Gracias a los conocimientos obtenidos sobre la causa y transmisión de esta enfermedad y el desarrollo de antibióticos eficaces, la TB se controló en los países desarrollados, mientras que en países en vías de desarrollo la mortalidad y la morbilidad se igualan a los niveles del siglo XIX (Ryan & Ray, 2004).

Materiales y métodos

Diseño del estudio

Esta investigación fue del tipo descriptivo transversal realizada en el período comprendido entre junio y agosto del año 2010 en el INH “Leopoldo Izquieta Pérez”-

Quito, que se caracteriza por ser la institución de referencia regional para el diagnóstico de TB. Este estudio contó con el permiso del Comité de Bioética de la Universidad Central del Ecuador, así también de una carta de consentimiento firmada por cada paciente participante.

Población y muestra

La población de estudio estuvo conformada por pacientes que acudieron al laboratorio de Tuberculosis del INH “Leopoldo Izquieta Pérez” de Quito. Estos pacientes pertenecían a diferentes provincias del Ecuador y, a la vez dentro de este grupo se encontraron pacientes hospitalizados. Para formar parte de la investigación los pacientes fueron seleccionados bajo los siguientes criterios de inclusión: pacientes con sospecha de TB, pacientes con resistencia a múltiples drogas (MDR), pacientes diagnosticados con VIH y pacientes con problemas renales, excluyéndose a los pacientes que se realizaban control para TB.

La muestra de estudio estuvo conformada por 104 pacientes entre 5 y 84 años de edad que acudieron directa o indirectamente al INH. De los pacientes que formaron parte del estudio se recolectó una muestra biológica de esputo o cinco de orina por paciente, dando un total de 236 muestras biológicas analizadas, de las cuales 30.08% (71/236) fueron de esputo y 69.92% (165/236) de orina. Para cada muestra se utilizaron dos medios de cultivo selectivos Löwenstein-Jensen y Stonebrink; una vez aislada la bacteria se identificó su especie por medio de las pruebas bioquímicas de Niacina, Reducción de Nitratos, Ureasa, Pirazinamidasas, NaCl 5%, Preferencia de Oxígeno y Catalasa pH 7 a 68°C.

Encuesta sobre factores de riesgo

Una vez seleccionada la muestra de estudio, se procedió a la aplicación de la encuesta para análisis de factores de riesgo. La encuesta se fundamentó en tres aspectos: información general, información del paciente y datos epidemiológicos.

Análisis estadístico

Se calculó la prevalencia de aislamiento de colonias de *Mycobacterium* en muestras biológicas de orina o esputo con un 95% de intervalo de confianza (I.C.) en base a la distribución normal del estimador. Para determinar la relación existente entre factores de riesgo y sintomatología con el cultivo *in vitro* positivo, se realizó un análisis estadístico utilizando las pruebas de asociación de variables categóricas como son: la prueba de chi-cuadrado y el test exacto de Fisher, con un 5% de significación estadística. Adicionalmente en aquellos casos donde se encontró diferencia significativa o altamente significativa, se realizó una comparación de proporciones mediante el *Odds Ratio* (OD). Finalmente se realizó un análisis de regresión logística múltiple con las variables que presentaron diferencia significativa o altamente significativa. Todas las pruebas estadísticas fueron interpretadas, a

dos colas, para estimar los valores *P* a 95% de intervalo de confianza (I.C.). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software estadístico R versión 2.12.1 Copyright (C) 2010 y Microsoft Excel para la elaboración de las tablas dinámicas.

Resultados

De los 71 pacientes con muestras biológicas de esputo, las muestras de esputo de 15 de ellos presentaron desarrollo de bacterias en medio Löwenstein-Jensen y Stonebrink. Dentro del grupo de los positivos (*n*=15), la edad promedio fue de 47.6 años (edad mínima 19 y máxima 75 años) (*SD* ± 16.7). En lo relacionado al género 26.7% (4/15) de los pacientes fueron mujeres y 73.3% (11/15) hombres. Así mismo, de los 33 pacientes con muestras biológicas de orina, se obtuvo un paciente con resultado positivo para el cultivo *in vitro*, el cual era un paciente hombre de 26 años de edad, que pertenecía al cantón Alausí de la provincia de Chimborazo. El análisis de resultados se realizó únicamente en base a los resultados obtenidos de los pacientes con cultivo *in vitro* positivo para muestras de esputo.

Baciloscopia vs. cultivo *in vitro*

Al relacionar la BK y el cultivo *in vitro*, (Tabla 1) se encontró que del 18.3% (13/71) de los pacientes con BK+, las muestras de esputo de 84.6% (11/13) pacientes presentaron cultivo positivo y 15.4% (2/13) negativo. Se observa también que 5.6% (4/71) de los pacientes presentaron aislamiento positivo y BK-, cuyas muestras se caracterizaron por ser mucopurulentas o sanguinolentas sin BAAR.

Tabla 1. Comparación de resultados del cultivo *in vitro* vs. baciloscopia

Cultivo <i>In vitro</i>	Baciloscopia		Total
	<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	
	<i>n</i>	<i>n</i>	
<i>Negativo</i>	54	2	56
<i>Positivo</i>	4	11	15
Total	58	13	71

Elaborado por: la autora

La mayor parte de las BK+ se caracterizaron por ser muestras biológicas de esputo mucopurulentas con abundantes BAAR. Cabe mencionar que aún en muestras biológicas de saliva se encontraron escasos BAAR.

Cultivo *in vitro* e identificación bioquímica

Se encontró que de los 71 pacientes, las muestras de esputo de 21.1% (15/71) de los pacientes presentaron desarrollo de bacterias en medio Löwenstein-Jensen y Stonebrink. En el 80.0% (12/15) de estos pacientes, las bacterias aisladas e identificadas por pruebas bioquímicas correspondieron a *Mycobacterium tuberculosis*, mientras que los aislamientos del 20.0% (3/15) de los pacientes no pudieron ser identificados con el protocolo de identificación bioquímica utilizado en este estudio, por tanto solo se los clasificó como *Mycobacterium spp.*

Factores de Riesgo

Se obtuvieron que los posibles factores de riesgo para obtener un aislamiento positivo para *Mycobacterium* fueron: paciente hospitalizado con afecciones respiratorias como neumonía, antecedentes de enfermedad tuberculosa, padecimiento de enfermedad crónica y consumo de leche no pasteurizada.

Análisis de asociación de las variables en estudio

Se elaboraron varias tablas de contingencia para determinar si existió alguna relación entre las diferentes variables en estudio. Encontrándose estadísticamente significativas a las variables: tipo de muestra biológica, baciloscopia positiva, paciente hospitalizado, consumo de leche no pasteurizada, sudoración nocturna y diabetes.

Regresión logística múltiple

El presente análisis se realizó con la finalidad de determinar si realmente las variables anteriormente analizadas formaban parte de los principales factores de riesgo y sintomatología asociados con el aislamiento de colonias en el cultivo *in vitro*. Las variables en estudio se dividieron en dos grupos: factores de riesgo y sintomatología (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Factores de riesgo asociados con el cultivo *in vitro* positivo mediante el análisis de regresión logística múltiple

Variables	P value*	Odds ratio	IC 95%
<i>Hospitalizado</i>	0.0128*	8.210	1.564 - 43.088
<i>Diabetes</i>	0.0186*	25.488	1.719 - 377.804
<i>Bronquitis</i>	0.1782	6.372	0.430 - 94.451
<i>Alcohol</i>	0.1251	4.347	0.665 - 28.442

Elaborado por: la autora

*Cuando $P < 0.05$ variable estadísticamente significativa; $P > 0.05$ variable no significativa.

Como se observa en la tabla 2, se encontró diferencias estadísticas significativas en las variables hospitalizado ($P=0.0128$) y diabetes ($P=0.0186$). Al realizar este análisis se excluyó la variable *consumo de leche no pasteurizada o cruda* de los factores de riesgo para TB, debido a que los valores de respuestas obtenidos fueron bajos y no permitían el estudio de las otras variables.

Tabla 3. Sintomatología asociada con el cultivo *in vitro* positivo mediante el análisis de regresión logística múltiple

Variables	P value*	Odds ratio	IC 95%
<i>Baciloscopia</i>	1.05E-05*	100.857	12.959 - 784.953
<i>Sudoracion nocturna</i>	0.367	3.153	0.260 - 38.266
<i>Pérdida de peso</i>	0.207	4.257	0.448 - 40.437

Elaborado por: la autora

*Cuando $P < 0.05$ variable estadísticamente significativa; $P > 0.05$ variable no significativa.

Como se observa en la tabla 3, se encontró diferencia estadística altamente significativa en la variable baciloscopia ($P<0.001$). Al realizar este análisis se excluyó a la variable *hemoptisis* del grupo sintomatología para TB, debido a que los valores de respuestas obtenidos fueron bajos y no permitían el estudio de las otras variables. Así mismo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa en la variable sudoración nocturna dentro de la sintomatología.

Cálculo de prevalencia

La prevalencia de aislamiento se calculó en base a los cultivos *in vitro* positivos obtenidos en este estudio durante el periodo comprendido entre junio y agosto del año 2010. Encontrándose una prevalencia de aislamiento en orina y esputo de colonias de micobacterium de 15.38% (16/104) con un IC: 9.32-24.08.

Discusión

La prevalencia obtenida en este estudio de 15.38% (16/104) correspondiente a los meses de junio-agosto del 2010 guarda similitud con la prevalencia de 16.71% (177/1059) presentada por el INH para el año 2009. La diferencia numérica encontrada en este estudio se atribuye a que el tiempo de muestreo no es el mismo y el número de pacientes muestreados difieren. No podemos generalizar la prevalencia obtenida en este estudio con la prevalencia encontrada por el INH, pero este resultado nos indica que la TB continúa siendo un problema de salud pública en nuestro país.

Baciloscopia positiva y cultivo positivo o negativo

La BK si bien tiene una especificidad muy alta 90-99%, no se considera como un examen totalmente confiable pues su sensibilidad oscila entre 25-30% (Kabra, *et al.*, 2004), es por esta razón que el bacilo no siempre es detectado en las muestras clínicas examinadas. El resultado del cultivo negativo de las 2 muestras con BK+ puede darse por diversas causas (Toman, 2007). Estudios realizados mencionan que no siempre la presencia de BAAR en la BK garantiza que se trate de un bacilo tuberculoso, en pocos casos puede tratarse de una micobacteria atípica o de otro microorganismo que comparta características de alcohol ácido resistencia (*M. leprae*, *Actinomyces*, *Nocardia*), así también en pacientes que reciben quimioterapia los bacilos pueden haber perdido su capacidad para crecer en los medios de cultivo y estar muertos o no viables, como es el caso de pacientes que son tratados con rifampicina que negativizan su cultivo alrededor de la tercera semana de quimioterapia, además otros factores como la exposición de la muestra a la luz solar o al calor, almacenamiento prolongado de la muestra y secado de la misma, descontaminación excesiva antes de la siembra, sobrecalentamiento durante la centrifugación, medios de cultivo inadecuados e incubación deficiente, pueden también generar un cultivo negativo con BK+ (Nava, *et al.*, 2005; Toman, 2007).

Baciloscopia negativa y cultivo positivo

El 5.6% (4/71) de los pacientes presentaron BK- y aislamiento positivo de sus muestras, esto indica que a pesar de la alta especificidad de la BK, la baja sensibilidad de la prueba no siempre nos permitirá observar los BAAR que se encuentren en una muestra, ya que existe la posibilidad que en la porción de muestra seleccionada no se haya tomado aquella que contenga a los bacilos tuberculosos. Como regla deben existir entre 5.000 a 10.000 bacilos por ml de expectoración para que exista un 50% de posibilidades de ser detectados al microscopio (Nava, *et al.*, 2005).

Cultivo *in vitro* e identificación bioquímica

Los datos obtenidos en este estudio de aislamiento y tiempo de crecimiento de colonias en medios Löwenstein-Jensen (LJ) y Stonebrink (ST) son concordantes con los estudios de Sepúlveda, *et al.*, (2001), quienes analizaron el índice de recuperación y tiempo de detección de micobacterias a partir de muestras clínicas empleando dos medios de cultivo a base de huevo, LJ y ST, obteniendo que LJ tiene una sensibilidad del 87.1% y ST del 83.3% para el aislamiento de colonias (Nava, *et al.*, 2005). Demostraron que el uso de ST con piruvato permitió recuperar hasta un 8.6% de las cepas de *M. tuberculosis*, la mayoría de cepas de *M. bovis* y otras especies, lo que sugiere que el uso de ambos medios ayuda en el aislamiento de *M. tuberculosis*. Así también analizaron el tiempo de crecimiento de esta especie, encontrando que era similar para los dos medios con una notable diferencia en días a favor de los medios suplementados con piruvato, debido a la mayor riqueza del mismo.

Si bien las pruebas bioquímicas son extensamente utilizadas, presentan algunos problemas que influyen en la identificación y manejo clínico de las infecciones por micobacterias, como por ejemplo la falta de reproducibilidad de los datos. La reproducibilidad está relacionada con la expresión de un fenotipo determinado, el cual depende de condiciones ambientales, así se pueden observar diferentes resultados al modificarse factores como la preparación de los medios y reactivos, la cantidad y tiempo de crecimiento de la cepa a identificar, e incluso el observador, que debe tener experiencia en este tipo de pruebas (Godoy, *et al.*, 2008). Esta información justifica algunos de los resultados obtenidos; por ejemplo de las micobacterias aisladas de un medio LJ se obtuvo un resultado positivo para la prueba de pirazinamidasa y un resultado negativo cuando las mismas micobacterias fueron aisladas del medio ST, por lo que es importante considerar en el análisis global de los resultados las variabilidades que se pueden presentar en las pruebas bioquímicas.

Factores de riesgo

Dentro de los pacientes con antecedentes de TB, un grupo presentó manifestaciones clínicas de la enfermedad con un tiempo promedio de 3.10 años referidos hasta el año 2010, y el 22.7% (5/22) de este grupo obtuvo nuevamente cultivo positivo para *Mycobacterium*. Estos resultados muestran que aún cuando un paciente recibe tratamiento para TB, tiene la probabilidad de una recaída, por lo que es de suma importancia tomar en

cuenta el surgimiento de alguna manifestación clínica relacionada con la enfermedad en pacientes con antecedentes de TB.

Los síntomas respiratorios como tos productiva y/o tos con flema por más de 15 días son característicos de la TB pulmonar cuando aumenta su grado de severidad (Salazar & Sáenz, 2005). Es por esta razón que dentro de la estrategia DOTS (Tratamiento acortado estrictamente supervisado) se hace énfasis en la captación de sintomáticos respiratorios, por ser éstos uno de los principales factores de riesgo para contagiar a una persona sana con TB. En este estudio al realizar el análisis de regresión logística múltiple se obtuvo que el examen de baciloscopia era altamente significativo, lo que nos llevó a inferir que la sintomatología tos productiva y tos con flema por más de 15 días, requisitos previos para este examen, constituyen uno de los principales factores de riesgo para adquirir TB con respecto a otra sintomatología.

La presencia de enfermedades concomitantes que alteran el sistema inmunitario, tales como la diabetes mellitus y el VIH, incrementan el peligro del paciente a padecer TB (Moreno, et al., 2006). Investigaciones realizadas muestran que un paciente con diabetes tiene mayores probabilidades de padecer TB frente a los que no tienen diabetes (Dooley & Chaisson, 2009). Tal como lo demuestran los resultados obtenidos en este estudio, el padecimiento de diabetes en los pacientes participantes influye directamente para un aislamiento positivo al cultivo.

En conclusión, en base a los resultados obtenidos pudo establecerse que *M. tuberculosis* fue la especie aislada con mayor frecuencia en muestras de orina y esputo de los pacientes que acudieron al laboratorio de TB del INH “Leopoldo Izquieta Pérez” de Quito. Así mismo se encontró que los principales factores de riesgo que provocaron un aislamiento positivo para *Mycobacterium* fueron las afecciones respiratorias como neumonía presentada en pacientes hospitalizados y la presencia de diabetes. Dentro de la sintomatología de TB pulmonar se determinó que la presencia de síntomas respiratorios como tos productiva y/o tos con flema por más de 15 días, constituyen factores de riesgo importantes.

Agradecimientos

Agradecemos al apoyo financiero del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica. Nuestros sinceros agradecimientos al personal de laboratorio del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez”-Quito y a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.

Referencias

Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J, Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F.A.K., de Kantor, I., Meslin, F.X. 1998. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *Emerging Infectious Diseases* 4: 59-70.

Dooley KE & Chaisson RE. Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics. *The Lancet infectious diseases* 2009; 9:737-746.

Godoy, M., Orozco, L., Hernández, C., DaMata, O., De Waard, J., & González, R. (2008). Identificación de micobacterias no tuberculosas: comparación de métodos bioquímicos y moleculares. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2008; 28: , 96-104.

Jawetz, M. & Adelberg. (2002). Micobacterias. En: *Microbiología Médica*. Vásquez I., editor, Editorial El Manual Moderno. México D.F. Santafé de Bogotá.

Kabra, S., Lodha, R., & Seth, V. (2004). Some current concepts o childhood tuberculosis. *Indian Journal Medical Respiratory* 120, 387-397.

Moreno, R., Rodriguez, G., & Martinez, O. (2007). Incidencia de recaída y factores de riesgo asociados en pacientes con tuberculosis pulmonar. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 45 (4): 335-342.

Nava, O., Hassanhi, M., & Prieto, L. (2005). Evaluación de la baciloscopia, cultivo y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. *Kasmera* v.33 n.2 , 119-131.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2004). El control de las enfermedades transmisibles. Washington D.C.

Ryan, K., & Ray, G. (2004). Sherris, *Microbiología Médica: Una introducción a las enfermedades infecciosas*. México: McGraw Hill.

Salazar, A., & Sáenz, D. (2005). Criterios Técnicos y Recomendaciones Basadas en Evidencia para la Construcción de Guías de Práctica Clínica para el Primer y Segundo Nivel de Atención. Disponible en internet en: <http://www.ccss.sa.cr/>

Sepúlveda, A., García, P., Rodríguez, M., Márquez, A., Puerto, J., & Saldarreaga, A. (2001). Evaluación del medio de Stonebrink para la recuperación de micobacterias. *Revista de Diagnóstico Biológico* V 50 N(4).

Toman, K. (2007). Tuberculosis: Detección de casos, tratamiento y vigilancia. Preguntas y respuestas. *Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 376.