

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA


**EVALUACIÓN DE DOS TÉCNICAS ALTERNATIVAS
(TINCIÓN AURAMINA O Y PCR HEMIANIDADA IS6110)
PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS**

María Eugenia Castellanos Reynosa

Química Bióloga

Guatemala, agosto del 2005

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**EVALUACIÓN DE DOS TÉCNICAS ALTERNATIVAS
(TINCIÓN AURAMINA O Y PCR HEMIANIDADA IS6110)
PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS**

Informe de Tesis

Presentado por

María Eugenia Castellanos Revnosa

Para optar al título de
Química Bióloga

Guatemala, agosto del 2005

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	5
A. Generalidades sobre tuberculosis	5
1. Epidemiología	5
2. Agente causal	6
3. Transmisión	7
4. Presentación clínica	8
5. Co-infección tuberculosis y VIH	8
B. Técnicas diagnósticas para la detección de tuberculosis ..	10
1. Tinciones de ácido resistencia.....	10
2. Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
3. Pruebas basadas en reacción antígeno- anticuerpo..	15

	4. Reacción en cadena de la polimerasa	16
	
IV.	JUSTIFICACIÓN	21
V.	OBJETIVOS	23
VI.	HIPÓTESIS	24
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
	A. Universo de trabajo	25
	B. Recursos	25
	1. Humanos	25
	2. Institucionales	25
	
	3. Físicos	26
	
	C. Procedimiento	31
	1. Recolección y tratamiento de las muestras	31
	
	2. Preparación de la muestra y extracción del ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> para PCR	31
	3. Técnica de PCR hemianidada IS6110	32
	
	4. Tinción de auramina O	33
	
	5. Obtención de resultados de tinción Zieh- Neelsen y cultivo de <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i>	33
	D. Análisis de datos	34

VIII.	RESULTADOS	35
IX.	DISCUSION DE RESULTADOS	52
X.	CONCLUSIONES	61
XI.	RECOMENDACIONES	62
XII.	REFERENCIAS	64
XIII.	ANEXOS	69
	Anexo 1: Protocolo de extracción de ADN de <i>M. tuberculosis</i> en esputos	70
	
	Anexo 2: Protocolo de extracción de ADN de <i>M. tuberculosis</i> en orinas y secreciones	72
	
	Anexo 3: Protocolo de extracción de ADN de <i>M. tuberculosis</i> en líquidos cefalorraquídeos	74
	
	Anexo 4: Protocolo de extracción de ADN de <i>M. tuberculosis</i> en tejidos	76
	
	Anexo 5: Protocolo No. 1 de extracción de ADN de <i>M. tuberculosis</i> en médulas óseas	78
	
	Anexo 6: Protocolo No. 2 de extracción de ADN de <i>M. tuberculosis</i> en médulas óseas	80
	
	Anexo 7: Técnica de PCR hemianidada IS6110	82
	
	Anexo 8: Preparación de reactivos para la tinción	86

auramina O	
Anexo 9: Técnica de tinción con auramina O	88
.....	
Anexo 10: Reporte de BAAR de acuerdo a la Comisión Nacional de Tuberculosis	90
.....	
Anexo 11: Análisis de resultados I: Fórmulas para cálculo de indicadores para evaluación de prueba diagnóstico	91
Anexo 12: Análisis de resultados II: Cálculo de índice <i>Kappa</i> (<i>k</i>) e Interpretación	92
.....	
Anexo 13: Información Clínica de pacientes que presentaron un resultado de PCR positivo/ZN y cultivo negativo en esputos	93
Anexo 14: Información Clínica de pacientes que presentaron un resultado de PCR positivo/ZN y cultivo negativo en LCRs	95
Anexo 15: Información Clínica de pacientes que presentaron un resultado de Auramina O /ZN y cultivo negativo	96
Anexo 16: Información Clínica de pacientes que presentaron un resultado de Auramina O dudoso	97
.....	

ACTO QUE DEDICO

A Silvia Quintana de Valladares, por ser un ejemplo de lucha, entereza y valentía. Has sido un testimonio de amor, fe y esperanza para nuestra familia, y Dios nos ha bendecido particularmente a través de ti. Que tengas toda la fuerza y gracia, por siempre.

AGRADECIMIENTOS

A Jesús y la Virgen María, verdaderos coautores de este trabajo. A Ti, Jesús, por ser la Luz que ilumina, bendice y motiva el camino de mi vida. A ti, Virgencita, por ser mi alegría, refugio y consuelo.

A mis padres, Roberto y Ma. Eugenia, por todo el apoyo y amor que siempre me han brindado. A ti, madre, por ser el mejor ejemplo de entrega, generosidad e integridad que puedo tener, por ser una mujer, profesional y madre excepcional. A ti, padre, por ser mi guía de responsabilidad, integridad y rectitud y por todo tu cariño.

A mis hermanos, Alejandro y Juan Luis, por su compañía, cariño y protección.

A mis abuelitos, Lucy⁺ y Manuel⁺, Humberto y Zoila, porque ustedes son los pilares fundamentales de esta maravillosa familia a la que pertenezco.

A toda mi familia, tías, tíos, primos; a esta familia fiel, generosa y unida, porque nos hemos acompañado, querido y motivado siempre.

A Ana, por tu presencia y apoyo en los momentos de luz y de sombra; porque a través de ti conocí el significado completo de la palabra "amistad".

A Ana Mary, Rebeca, Claudia, Gaby, Ma. Emilia, Marinita, Miriam y Carolina; gracias por todos los momentos compartidos, por su amistad, cariño y ayuda.

Al colegio Monte María, "mi Alma Mater", por darme lecciones que moldearon mi vida, haciéndome comprender la alegría del servicio.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por educarme y permitir educar, por ser una fuente del saber, de generosos sueños y de alegría. A mis maestros, especialmente a la Licda. Heidi Logemann, Licda. Liliana Acevedo, Licda. Ma. Luisa García, Licda. Ma. del Carmen Bran; por todas sus generosas enseñanzas, por hacer que me enamorará del fascinante mundo de la microbiología.

A todas las personas del Departamento de Bioquímica, por su gran apoyo. Especialmente al Dr. Rubén Velásquez, por ser un ejemplo de maestro y profesional, y a la Licda. Alba Marina Valdés, por brindarme tantas oportunidades, por su impulso y por enseñarme a ver siempre más allá.

A mis asesoras, M.S.c. Ana María Xet-Mull, M.S.c. Blanca Samayoa, Licda. Rosario Hernández; por sus consejos, paciencia y dedicación. Por ser profesionales visionarias que me permitieron involucrarme en un proyecto grande y bueno, encaminado al servicio de hermanos guatemaltecos.

A la Dra. Sonia Montenegro, porque fue pieza fundamental en lograr el éxito del presente trabajo; por su gran generosidad, por su genuino interés, por todas sus enseñanzas y por su amistad.

A mis revisoras, Licda. Alba Marina Valdés, Licda. Amanda Gálvez, Licda. Ma. Paula De León y Licda. Margarita Paz; porque este trabajo es mejor gracias a ustedes.

Al personal de la Clínica Familiar “Luis Ángel García”, del Laboratorio de Micobacterias y Hongos del HGSJDD y del Departamento de Citohistología. Especialmente agradezco a Carmen Palacios, Lucrecia Paz, Karla Armas, Marta María Méndez y Josué Barrios+, por su valiosa colaboración en la realización de esta investigación.

A tantas y tantas personas que en los momentos de necesidad me brindaron su mano generosa y fueron eslabones de una cadena de apoyo que hizo posible llegar al final del presente trabajo.

MIEMBROS DE JUNTA DIRECTIVA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Juan Frascico Carrascoza Mayen	Vocal IV

Br. Susana Elizabeth Aguilar Castro

Vocal V

I. RESUMEN

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas humanas con mayores tasas de mortalidad e incidencia en Guatemala. En los últimos años ha aumentado el número de casos en poblaciones inmunocomprometidas, tal es el caso de los pacientes con VIH/SIDA.

A lo largo de la historia, el diagnóstico de tuberculosis ha representado un verdadero desafío para el personal de laboratorio, ya que las técnicas convencionales de diagnóstico no son lo suficientemente rápidas ni sensibles para el adecuado manejo y control de la enfermedad. Por tal motivo, es necesario que en Guatemala se desarrollen y evalúen nuevas metodologías con mayor sensibilidad, especificidad y rapidez que las convencionales.

En el presente estudio se evaluó la exactitud (proporcionada por los indicadores de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos) y concordancia (valor *Kappa*) de las técnicas de PCR hemianidada IS6110 y tinción auramina O a un nivel de confianza del 95% con respecto al cultivo de *M. tuberculosis* como método de referencia para el diagnóstico de tuberculosis en pacientes co-infectados con VIH.

La tinción de auramina O demostró tener una sensibilidad superior respecto a la tinción convencional de Ziehl Neelsen (27.3% vs. 15.4%), con especificidades relativamente similares para ambas técnicas (92.5% y 99.0%), con lo que se concluye que la tinción de auramina O es una técnica más sensible que la tinción de Ziehl Neelsen para el diagnóstico directo de tuberculosis en pacientes co-infectados con VIH. En el caso de

la técnica de PCR hemianidada IS6110 utilizada (N2-PCR modificado), ésta se estableció como un ensayo rápido altamente sensible (100.0%), representando una valiosa adición al diagnóstico temprano de tuberculosis en pacientes viviendo con VIH/SIDA.

La tinción de Ziehl Neelsen presentó el mejor resultado de especificidad respecto al cultivo (99.0%), seguido por la auramina O (92.5%) y la PCR (72.5%). Sin embargo estos valores son discutibles ya que a través de la presente investigación se estableció que el cultivo en el medio de Löwenstein Jensen debe ser reevaluado como método de referencia para la confirmación de falsos positivos por PCR y auramina O.

Con relación a los valores predictivos positivo y negativo (calculados con respecto a las muestras y no a los pacientes) el valor predictivo positivo del ZN fue el mayor (66.7%), comparado con el de la AO (30.0%) y el del N2-PCR modificado (17.6%). Por otro lado, el valor predictivo negativo para todas las técnicas fue mayor del 90%.

El grado de concordancia entre las técnicas evaluadas y el cultivo fue interpretado como sufrible para ZN y N2-PCR modificado y pobre para AO. Conjuntamente, cuando se analizó el grado de concordancia global entre estas tres últimas técnicas, la combinación con el mejor resultado fue AO y PCR (0.40), seguida por AO y ZN (0.26) y terminando con ZN y PCR (0.14). Sin embargo, el grado de concordancia entre todas las técnicas evaluadas fue bastante inadecuado y estudios posteriores deben ser realizados para la optimización de estos ensayos.

En conclusión, las técnicas evaluadas (N2-PCR modificado y tinción auramina O) se establecieron como herramientas diagnósticas rápidas más sensibles que la tinción convencional (Ziehl Neelsen) y su uso puede disminuir significativamente el tiempo de diagnóstico de la TB, con lo que se contribuirá al adecuado control y manejo de esta enfermedad en Guatemala.

II. INTRODUCCIÓN

Cada año dos millones de personas mueren y ocho millones se enferman de tuberculosis (TB) (1). Un diagnóstico de laboratorio rápido, sensible y específico es obligatorio para garantizar la detección y tratamiento adecuados para TB, especialmente en personas infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), quienes representan uno de los grupos poblacionales más susceptibles de contraer esta enfermedad (2-4).

Las técnicas convencionales utilizadas en Guatemala para el diagnóstico de la tuberculosis son la observación directa de *Mycobacterium tuberculosis* a través de baciloscopía utilizando una tinción alcohol-ácido resistente y el cultivo en medio Löwenstein Jensen; este último se realiza en unos cuantos laboratorios (4, 5). Sin embargo, estas técnicas presentan varias deficiencias, por ejemplo, la baciloscopía es poco sensible, porque requiere aproximadamente 10^4 bacilos por mililitro de muestra concentrada para la obtención de un resultado positivo y el cultivo, que si bien posee mejor sensibilidad, requiere de tres a seis semanas de incubación para evidenciar crecimiento de *M. tuberculosis* (6-8).

Tecnologías recientemente evaluadas para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar incluyen a aquellas que amplifican el ácido desoxirribonucleico de *M. tuberculosis* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Entre éstas, la PCR dirigida contra la secuencia de inserción IS6110, ha demostrado alta sensibilidad y especificidad en varios ensayos clínicos utilizando distintas muestras biológicas (6, 9-15). Estas características sugieren que la técnica puede resultar de gran utilidad para el diagnóstico temprano de TB, especialmente en pacientes con resultados de baciloscopías negativos (12, 14, 15).

Por otro lado, las tinciones con fluorocromos tales como auramina O y auramina-rodamina pueden representar una alternativa a la tinción convencional con carbolfucsina (Ziehl-Neelsen, Kinyoun); aunque ambos tipos de tinciones poseen sensibilidad similar, las tinciones con fluorocromos son más ventajosas ya que el frote puede ser observado rápidamente al microscopio con un objetivo de bajo aumento (6, 16-18).

El presente estudio evaluó la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, y la concordancia de la tinción auramina O y un ensayo de PCR hemianidada IS6110 con respecto al cultivo de *Mycobacterium* sp. para el diagnóstico de TB. Las muestras biológicas provinieron de pacientes infectados con VIH que asistieron a la Clínica Familiar "Luis Ángel García" del Hospital General San Juan de Dios de Guatemala, durante el período de septiembre a diciembre del 2003.

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades sobre tuberculosis

1. Epidemiología

La tuberculosis (TB), enfermedad causada por el agente *Mycobacterium tuberculosis*, representa una grave amenaza para la salud pública mundial. A pesar de ser una enfermedad tratable y curable, la TB es responsable de la muerte de dos millones de personas al año y se estima que un tercio de la población mundial está infectada con TB. Anualmente, ocho millones de personas contraen la enfermedad y la incidencia mundial aumenta 0.4% por año, principalmente en África subsahariana y países de la antigua Unión Soviética (1, 6, 19, 20).

Dicho aumento puede explicarse por factores tales como: la coinfección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el deterioro de los servicios de salud pública, programas nacionales de control de la TB pobremente apoyados y organizados, a la emergencia de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes (MDR, por sus siglas en inglés), al aumento en el número de personas que viven en condiciones de hacinamiento y a diversos estados que causan inmunocompromiso (edad, alcoholismo, diabetes mellitus, tratamientos inmunosupresores, etc.)(1, 2, 6).

En el año 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó 4,281 casos nuevos de TB con resultado de baciloscopía(s) positivo en Guatemala. Sin embargo, de éstos únicamente 1,669 fueron reportados, lo que representaría sólo un 39% de tasa de detección de casos nuevos (20). Ese mismo año el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social reportó una disminución de la incidencia de tuberculosis del 39% con relación al año anterior y determinó como zonas de mayor riesgo a los departamentos de Escuintla, Retalhuleu, Suchitepéquez, Petén suroriente, Izabal y Quetzaltenango. La tuberculosis pulmonar se reportó principalmente en personas de 20 a 39 años y en mayores de 60 años (21).

Si la TB no es controlada adecuadamente, se estima que entre los años 2002 y 2020, 1000 millones de personas estarán infectadas con TB, 150 millones contraerán la enfermedad y 36 millones morirán a nivel mundial (1).

2. Agente causal

El género *Mycobacterium* incluye a casi 100 especies. Las micobacterias son bacilos delgados, aeróbicos, inmóviles, ligeramente curvos o en forma de caña recta, que miden de 0.2-0.6 μm por 1.0-10 μm . Las especies micobacterianas usualmente se han separado en dos grupos: las pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* y las llamadas micobacterias no tuberculosas (MNTs) (7, 22).

El principal agente causal de TB es *M. tuberculosis*, organismo del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual también incluye a *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canetti* (7,22). *M. tuberculosis* es el agente causal de la mayoría de casos de TB humana, sin embargo, cualquier especie del complejo *M. tuberculosis* puede causar infección tuberculosa (7).

El complejo *M. avium* (MAC), se ha convertido en una de las principales MNTs asociadas a enfermedad. En pacientes con patología pulmonar previa que no padecen el SIDA, el complejo MAC generalmente causa infección de tipo pulmonar, no diseminada. Por el contrario, en pacientes que padecen el SIDA, la infección es usualmente diseminada (7, 22).

3. Transmisión

La tuberculosis se transmite principalmente por inhalación de aerosoles infecciosos que engloban bacilos de *M. tuberculosis*. Otras posibles vías de transmisión son la ingestión de leche u otro material contaminado, y la inoculación directa, usualmente en trabajadores de salud como accidente ocupacional (6).

M. tuberculosis se transmite por el aire cuando las personas con tuberculosis pulmonar estornudan, tosen, hablan o cantan. Los bacilos inhalados por un hospedero susceptible se implantan en los bronquiolos respiratorios o alvéolos; desde allí la micobacteria puede dispersarse a otras regiones del cuerpo (8,19).

La mayoría de hospederos que se infectan por *Mycobacterium tuberculosis* permanecen asintomáticos, sin embargo, del 8 al 10% de todos los inicialmente infectados contraen la enfermedad o son infecciosos al no poder controlar los microorganismos (1, 6, 8).

Múltiples factores pueden determinar la respuesta patológica a la infección, entre ellos se encuentran: a) factores intrínsecos: la población de linfocitos reactivos presentes en el hospedero, la cantidad de antígeno que se encuentre en la bacteria y las características estructurales del tejido involucrado; b) co-existencia de otras enfermedades: diabetes mellitus, silicosis, patologías asociadas con inmunosupresión (v.g. infección con VIH) y c) factores farmacológicos: ingesta de corticosteroides y otras drogas inmunosupresoras (8).

Además se ha observado que existe una disminución en la capacidad de neutralización primaria a la infección durante los dos primeros años de vida, en la pubertad, adolescencia y período post-parto (8). La co-infección VIH-TB, por su importancia particular, será discutida a profundidad más adelante.

4. Presentación clínica

La TB activa se desarrolla por la reactivación de una infección latente, usualmente años después de la infección primaria o por una infección reciente que inmediatamente progresa a enfermedad activa, sucediendo este caso usualmente en infantes y personas viviendo con VIH (2,6).

Entre los síntomas más comunes de la TB se encuentran: fiebre, tos violenta y pérdida de peso (8, 19). A pesar de ello, muchos pacientes no presentan síntomas o los presentan en forma insidiosa, lo que dificulta el diagnóstico de la tuberculosis, especialmente la TB extrapulmonar (6,8). Cualquier órgano puede ser afectado por *Mycobacterium tuberculosis*, v.g. sistema genitourinario, linfáticos, huesos, articulaciones y meninges (8).

5. Co-infección tuberculosis y VIH

Las personas infectadas con VIH presentan mayor riesgo de contraer tuberculosis primaria o reactivada y un segundo episodio de reinfección exógena (3, 19, 23). El riesgo de desarrollar tuberculosis clínica en pacientes co-infectados con *M. tuberculosis* y VIH es del 8% anual, comparado con el riesgo del 8 al 10% de por vida en las personas que son seronegativas al VIH (2).

El VIH acelera el paso de infección con *M. tuberculosis* a enfermedad activa (3). Se ha sugerido que la susceptibilidad de pacientes infectados con VIH a la TB se debe a una respuesta disminuida de los linfocitos T CD4+; dentro de estos, el subgrupo de linfocitos TH1, es de vital importancia en la respuesta inmunológica contra las micobacterias y se considera que en pacientes infectados con VIH se produce una reducción en la función de los mismos, ocasionando el desarrollo de TB (2,23).

A su vez, la tuberculosis puede tener influencia en el progreso de la infección con VIH al activar a los macrófagos que almacenan el virus (6, 24). Los macrófagos son inducidos por *Mycobacterium tuberculosis* a producir factor α de necrosis tumoral, interleucina 1 e interleucina 6, ocasionando el aumento en la replicación del VIH (2, 23).

La co-infección de TB y VIH ha demostrado ser una combinación mortal. La TB es la causa de muerte del 11% de pacientes con SIDA, a nivel mundial. El progreso de la infección con VIH, más que la TB parece ser el motivo de tan elevada mortalidad (1,23).

La relación VIH y TB también ha sido demostrada en Guatemala. En el año 2000, Velásquez-Porta *et al.* determinaron que la prevalencia de tuberculosis en pacientes viviendo con VIH/SIDA en una clínica hospitalaria guatemalteca fue del 22% (4). En el año 2001, Petén suroriente, Izabal y Escuintla, presentaron las mayores tasas de tuberculosis pulmonar; dichas regiones poseen la de mayor incidencia de SIDA a nivel nacional (21).

El diagnóstico de la TB en pacientes co-infectados con VIH puede resultar extremadamente difícil, ya que a menudo sus manifestaciones clínicas son particularmente inespecíficas y sutiles (6). En estos pacientes, la TB extrapulmonar es la forma más común de la enfermedad. Esta y la micobacteremia son más frecuentes a medida que la inmunosupresión aumenta (2, 23). Los síntomas pueden ser atípicos como abscesos cerebrales, bacteremia, lesiones de piel y/o meningitis, por mencionar algunos (6). Los hallazgos radiológicos pueden no ser representativos, por lo que las radiografías de tórax no son características de la enfermedad (2,6). En general, la presentación clínica de la TB meníngea es similar entre

pacientes inmunocompetentes y pacientes infectados con VIH, a excepción de que los últimos presentan lesiones intracerebrales con mayor frecuencia (23).

B. Técnicas diagnósticas para la detección de tuberculosis

La detección de TB ha sido realizada en el laboratorio a través del uso de métodos convencionales como: a) tinciones para ácido resistencia, b) cultivo y c) pruebas bioquímicas (2). Sin embargo, factores como el aumento mundial en la incidencia de la TB y el rápido progreso de la infección a enfermedad (especialmente en la población co-infectada con VIH) han creado la necesidad de introducir en el laboratorio herramientas diagnósticas más efectivas y de pronta detección y/o identificación de *M. tuberculosis* (25). Dentro de las nuevas técnicas diagnósticas que a nivel mundial se han desarrollado y evaluado se encuentran pruebas inmunológicas, cultivo del microorganismo en medios líquidos y ensayos moleculares que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (6, 7, 25).

1. Tinciones de ácido resistencia

Las micobacterias poseen un alto contenido de ácidos micólicos en la pared celular, lo que permite que ciertos colorantes se unan a la misma y no sea decolorada con alcohol-ácido (7,25). Por esta razón, se les denomina como bacilos alcohol-ácido resistentes (BAAR), propiedad que los distingue de otras bacterias (7).

Las tinciones de ácido resistencia pueden ser realizadas utilizando carbolfucsina (Ziehl-Neelsen o Kinyoun) o fluorocromos, como la auramina

O o auramina-rodamina (6, 7, 25). Estos colorantes primarios, carbolfucsina y auramina O, son los que se unen a los ácidos grasos de la pared micobacteriana (25).

La observación microscópica de BAAR en muestras clínicas es la primera indicación bacteriológica de que existen micobacterias (6, 8, 25). Sin embargo la detección de BAAR solamente debe considerarse evidencia presuntiva de TB, ya que estas tinciones no identifican específicamente a *M. tuberculosis* y otras MNTs también son detectadas (7,26). Por otro lado, las tinciones ácido resistentes no son muy sensibles, pues se requiere de aproximadamente 10^4 bacilos/ml de muestra (adecuadamente concentrada) para que éstos puedan ser detectados (6, 7, 25). Esto se demuestra en muestras que no han sido concentradas, las cuales presentan una sensibilidad menor comparada con la de las concentradas al teñir con este método (27).

En Guatemala también se ha establecido que la sensibilidad de la tinción con Ziehl-Neelsen no es la óptima. En el año 2000, Velásquez-Porta *et al.* realizaron un estudio evaluando la frecuencia y factores asociados en la co-infección TB y VIH/SIDA. Dentro de sus resultados cabe destacar que en muestras de pacientes infectados con VIH, la sensibilidad de la tinción de Ziehl-Neelsen con respecto al cultivo de micobacterias fue únicamente del 40%, si bien su especificidad fue del 95% (4).

En muestras extrapulmonares la tasa de detección ha resultado ser extremadamente pobre. En Francia, en el año 2003, Honoré-Bouakline *et al.* reportaron que únicamente dos de quince especímenes

extrapulmonares con cultivo positivo para *M. tuberculosis* fueron positivos para tinciones ácido resistentes (28).

a) Tinción de Ziehl-Neelsen

En la tinción con Ziehl-Neelsen o Kinyoun se utiliza carbolfucsina como primer colorante, los BAAR se presentan de color rojo brillante sobre un fondo azul o verde, el cual dependerá del colorante de contraste utilizado. Los frotis son examinados con el objetivo de inmersión para la detección de los bacilos (25).

b) Tinción con fluorocromos

En la tinción con fluorocromos, se puede utilizar como primer colorante la auramina, la rodamina o la combinación de ambas (auramina-rodamina). Esta última da un resultado más satisfactorio (16). Las tinciones con auramina O y auramina-rodamina resultan de la unión fisicoquímica entre el colorante primario y la pared micobacteriana, sin ser ensayos basados en una reacción antígeno-anticuerpo (25). Con estas tinciones, los BAAR se observan fluorescentes de color amarillo a naranja con auramina, rojizos con rodamina y amarillo-rojizos con auramina-rodamina sobre un fondo negro-verdoso al utilizar permanganato de potasio como colorante de contraste (16, 29).

Uno de los atractivos principales del uso de fluorocromos es que permiten la detección de BAAR en menos tiempo comparado con la

técnica convencional (Ziehl-Neelsen), ya que los bacilos pueden ser observados con objetivos de bajo poder (20, 25 ó 40X) para luego confirmar morfología con objetivo de inmersión (100X) (16, 30). Otra ventaja de la técnica es que permite reteñir el frote con la tinción con Ziehl-Neelsen para estudiar la morfología del organismo así como para su confirmación (7, 25, 30).

Para emplear adecuadamente las tinciones con fluorocromos es necesario ajustar apropiadamente los diferentes componentes del microscopio de fluorescencia con el fin de obtener la transmisión de luz óptima. En los laboratorios grandes donde la carga diaria de frotos es de 40 o más por día, se ha recomendado el uso de la microscopía de fluorescencia; la labor de los técnicos debe ser evaluada por un supervisor, ya que se requiere experiencia para distinguir a los BAAR de artefactos fluorescentes que puedan aparecer en algunos frotos (16,17).

c) Comparación entre Ziehl-Neelsen y tinción con fluorocromos

Desde hace muchos años diversos estudios se han llevado a cabo para comparar la tinción fluorescente con la tinción convencional de Ziehl-Neelsen, demostrándose que la tinción con auramina O o auraminarodamina es tanto o más sensible que la tinción convencional de Ziehl-Neelsen (16-18).

En 1959, Holst, Mitchison y Radhakrishna, al comparar la microscopía de fluorescencia (auramina O) con la técnica convencional de Ziehl-Neelsen determinaron que la microscopía por fluorescencia detecta tantos

frotos positivos como el Ziehl-Neelsen. De 1383 esputos evaluados, 655 (47.4%) fueron cultivo positivo. De las muestras con cultivo positivo, 405 (29.3%) fueron positivas para ambas tinciones, 36 (2.6%) fueron positivas únicamente por auramina O y 28 (2.0%) sólo por la técnica de Ziehl-Neelsen. Las restantes 186 muestras fueron negativas para ambas técnicas. Asimismo, entre las 699 muestras con cultivo negativo, la microscopía por fluorescencia no tendió a producir mayor número de falsos positivos (15 muestras) con respecto al número obtenido por Ziehl-Neelsen (14 muestras) (17).

Resultados similares fueron obtenidos por Truant, Brett y Thomas, evaluando el desempeño de la tinción auramina-rodamina para la detección de BAAR en un estudio que incluyó 3000 especímenes. El 5.6% de las muestras fue positivo tanto para cultivo, Ziehl-Neelsen y auramina-rodamina, 1.5% fue positivo únicamente para cultivo y auramina-rodamina, 0.5% únicamente para cultivo y Ziehl-Neelsen y 1.2% solamente por cultivo. De las muestras con cultivo negativo, 2.1% fueron positivas para ambas tinciones, 0.8% fueron positivas únicamente para auramina-rodamina y 0.5% para Ziehl Neelsen (16).

En Turquía, en el año 2000, Ulukanligil, Aslan y Tasci compararon la sensibilidad de la microscopía de fluorescencia (auramina O) con la técnica de Ziehl-Neelsen para el diagnóstico de TB, así como la correlación entre sensibilidad y número de muestras colectadas, utilizando el cultivo en Löwenstein Jensen como técnica de referencia. La mayoría de muestras colectadas fueron esputos, aunque también se incluyeron: orinas, lavados gástricos y otros. En pacientes que entregaron una muestra para detección de BAAR, la microscopía por fluorescencia con auramina O

presentó una sensibilidad superior a la tinción de Ziehl-Neelsen (83% vs. 61%). Lo mismo sucedió en pacientes que brindaron dos muestras, ya que la microscopía por fluorescencia tuvo una sensibilidad del 83% comparada con un 66% con la tinción de Ziehl Neelsen. En pacientes que entregaron tres o más muestras, la sensibilidad para la tinción con auramina O y el Ziehl-Neelsen fue del 92% y 80% respectivamente. Lo anterior indica que la sensibilidad de ambas técnicas es similar al contarse con más de dos especímenes y que la fiabilidad de la microscopía por fluorescencia es mayor que la tinción con Ziehl-Neelsen en el caso de contar con menos de tres muestras. Debido a que la microscopía por fluorescencia permitió la detección de frotis con baja cantidad de microorganismos, se concluye que éste es un método confiable, rápido, de bajo costo que puede ser utilizado en los laboratorios que manejan grandes números de muestras de esputo y cuentan con personal de laboratorio entrenado (18).

2. Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

El cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico de TB, ya que la recuperación del microorganismo a partir del cultivo es esencial para el establecimiento del diagnóstico definitivo de la enfermedad (8). La sensibilidad del cultivo no es total, ya que muchas micobacterias pueden no ser liberadas del material proteínico por el agente mucolítico y otras pueden morir debido a la acción del agente decontaminante, disminuyendo así la cantidad de inóculo (6). Sin embargo, se ha recomendado que todas las muestras clínicas sean cultivadas, ya que el cultivo es una técnica capaz de detectar 10 micobacterias/ml de material digerido y concentrado,

además permite la posterior identificación de la bacteria así como pruebas de susceptibilidad a drogas (8, 31).

Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de *M. tuberculosis* pueden ser sólidos o líquidos, incubados a 37°C durante seis a ocho semanas con un 10% de CO₂. Entre los medios sólidos se encuentran Löwenstein Jensen, Middlebrook 7H10, 7H11 y agar selectivo 7H11 (6, 7). La desventaja principal de los medios sólidos es que requieren de hasta 8 semanas de incubación para obtener un aislamiento, aunque la mayoría de aislamientos se obtienen entre las 3 y 6 semanas (7). El uso de medios líquidos ha logrado disminuir el tiempo necesario para el aislamiento de los bacilos. Entre éstos se encuentran el caldo Middlebrook 7H9 y el caldo radiométrico BACTEC® 12 B (6, 7, 25).

A partir del cultivo es posible realizar la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* evaluando la apariencia de las colonias y las pruebas bioquímicas, v.g. acumulación positiva de niacina, reducción de nitratos a nitritos, actividad débil de catalasa que se pierde al calentar a 68°C (8).

3. Pruebas basadas en reacción antígeno-anticuerpo

En los últimos años diversas pruebas inmunológicas, ya sea ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA) o inmunocromatográficos, se han evaluado para el serodiagnóstico de la tuberculosis (32-37).

Varios ensayos detectan anticuerpos (IgG, IgM o IgA) contra antígenos purificados o recombinantes de *M. tuberculosis*, principalmente

contra el antígeno de 38 kDa, así como contra componentes de la pared celular del microorganismo como los glucolípidos y el lipoarabinomano (LAM) (32, 33, 35). La detección de antígenos micobacterianos, como el LAM, también se ha evaluado en muestras clínicas de esputo utilizando anticuerpos monoclonales (34).

Estas pruebas son fáciles de utilizar, brindan resultados en poco tiempo, y pueden ser útiles para el monitoreo de la efectividad del tratamiento antituberculoso (32, 36). Sin embargo, los resultados han sido diversos con sensibilidades entre 9 al 94%, dependiendo de la población estudiada y el tipo de ensayo utilizado (32-37).

La desventaja de estos ensayos es que no son totalmente específicos para *M. tuberculosis*, pues presentan reactividad con micobacterias no tuberculosas, ya que componentes celulares como el LAM o los glicolípidos son compartidos por todas las micobacterias; también se ha reportado falsos positivos en pacientes con neumonía no tuberculosa (34-36).

4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR ha sido una de las más estudiadas para el diagnóstico rápido de *Mycobacterium tuberculosis* (9-13).

En la técnica de PCR el ácido desoxirribonucleico (ADN) o el ácido ribonucleico (ARN) del microorganismo es extraído a partir de una muestra clínica, amplificado y finalmente identificado (6, 15). En el caso de los ensayos de PCR que amplifican ADN, la doble hebra del ADN del microorganismo es desnaturalizada, seguidamente un par de cebadores

(*primers*) se alinean al extremo complementario de cada una de las hebras y la enzima polimerasa cataliza la extensión de la nueva hebra del ADN utilizando como molde a la hebra original. Después de repetir este ciclo de 20 a 40 veces, una sola copia de ADN es amplificada hasta 10^6 copias en 2-3 horas. El producto de amplificación es detectado e identificado por distintos métodos (6).

La sensibilidad de la PCR puede ser afectada por varios factores tales como: el proceso de extracción del ADN, los parámetros de amplificación (temperatura, tiempo y número de ciclos) y el método empleado para detectar e identificar al producto de amplificación del ADN. De la misma forma, la especificidad de la PCR es determinada en gran medida por los cebadores utilizados. Si los cebadores hibridizan muchas regiones distintas del ADN inicial (templado), la amplificación no se enfocará en el fragmento deseado. Esto origina productos de amplificación “bastados” y bajo rendimiento del producto de amplificación esperado. Entre los factores que afectan la especificidad de la hibridización del cebador al templado se encuentran la concentración del ión magnesio, la fuerza iónica del buffer y la temperatura (6, 38).

Para aumentar la especificidad de la reacción de amplificación se han desarrollado ensayos de PCR anidados (nested-PCR). En esta técnica se producen dos reacciones secuenciales de PCR. Después de someter el extracto de ADN a unos 10-20 ciclos de amplificación con un par de cebadores específicos, el producto obtenido de esta primera amplificación sirve como templado para una segunda reacción de amplificación más específica con un nuevo par de cebadores que hibridizan regiones internas o “anidadas” al primer producto de

amplificación. Las principales desventajas de la PCR anidada son: a) que requiere de cuatro cebadores en lugar de sólo dos y b) que requiere de ciclos adicionales para obtener el producto de la segunda amplificación (38).

a) Sensibilidad y especificidad de la PCR

La técnica de PCR ha probado ser altamente sensible en muestras respiratorias, encontrándose sensibilidades de 90 a 100% en muestras con baciloscopía positiva y cultivo negativo (12, 15). Más aún, la técnica de PCR ha resultado de gran utilidad para el diagnóstico temprano de TB en muestras respiratorias con baciloscopía negativa/cultivo positivo encontrándose sensibilidades entre el 61-77% (12,14, 15).

Las muestras extrapulmonares presentan mayores retos, ya que éstas usualmente contienen muy pocos bacilos tuberculosos y además inhibidores de la PCR, dificultando así la detección de *M. tuberculosis*. Las mayores tasas de inhibición se presentan en muestras de biopsia de tejido, aspirados de médulas óseas y abscesos. Por dicha razón el proceso de preparación de la muestra para la PCR es importante para alcanzar resultados más sensibles. Al comparar dos pruebas comerciales para preparación de muestras extrapulmonares para PCR, la sensibilidad con respecto al cultivo lograda con el primero de ellos fue del 84.6% contra el 27.2% del segundo (28).

En varios países latinoamericanos se ha evaluado la técnica de PCR contra los métodos convencionales de tinciones ácido resistentes y cultivo, obteniéndose resultados sumamente alentadores (11, 12).

Entre 1995 y 1996, Morán *et al.* realizó un estudio en México utilizando 252 muestras biológicas de distinto origen, v.g. esputo, orina, líquidos varios (pleural, sinovial, cefalorraquídeo). La PCR fue negativa para micobacterias no tuberculosas, haciéndolo sumamente específica para el complejo *M. tuberculosis*. Cuando se utilizó al cultivo como método de referencia, la PCR tuvo una sensibilidad del 92.3%, con una especificidad del 78.7%, un valor predictivo positivo del 20.3% y un valor predictivo negativo del 99.4%. Al evaluar únicamente las muestras de esputo, la sensibilidad fue del 90.9%, la especificidad del 89.5%, y los valores predictivos positivos y negativos fueron 52.6% y 98.7% respectivamente. En 44 muestras, la PCR fue positiva y los métodos convencionales (baciloscopía y cultivo) fueron negativos; lo cual le restó especificidad a la técnica de PCR. Con respecto a lo anterior, los autores concluyen que debido a que muchas de estas muestras no fueron respiratorias, el cultivo y la baciloscopía no pudieron detectar pequeñas cantidades de microorganismos y la PCR sí logró hacerlo al tener un límite de detección menor (11).

b) Ensayos de PCR dirigidos contra la secuencia de inserción *IS6110*

Numerosos ensayos de PCR utilizan cebadores dirigidos a la región *IS6110*, secuencia de inserción repetitiva del ADN micobacteriano, aunque otros se han dirigido hacia regiones del ARN ribosomal (6, 9, 10, 12, 14, 15). Thierry *et al.* describieron en 1989 a la secuencia de inserción *IS6110*, la

cual se repite de 10 a 20 veces en el genoma de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (39, 40).

Entre las ventajas principales de los ensayos de PCR dirigidos a la región IS6110 (PCR-IS6110), se encuentran: a) ser altamente específicos para la detección de miembros del complejo *M. tuberculosis* permitiendo la discriminación entre la infección por *M. tuberculosis* y la infección por micobacterias no tuberculosas y b) tasas de sensibilidad de 60% o más en pacientes con baciloscopia negativa/cultivo positivo (9, 10, 12, 14, 41).

Montenegro *et al.* evaluaron el desempeño de una PCR hemianidada contra la región IS6110, con respecto al cultivo y a tinciones ácido resistentes para el diagnóstico de TB en niños peruanos con manifestaciones clínicas de la enfermedad. Las muestras colectadas fueron aspirados gástricos, aspirados nasofaríngeos y esputos. Los resultados obtenidos con la PCR fueron comparados con los obtenidos por tinciones de ácido resistencia (Ziehl-Neelsen y auramina O), cultivo en medio de Löwenstein Jensen, combinación de tres medios de cultivo y el criterio clínico conocido como Stegen-Toledo, el cual, dependiendo de los signos y síntomas, clasifica en cuatro categorías, la probabilidad de padecer TB. Cuando se utilizó el criterio clínico Stegen-Toledo como método de referencia, la tasa de detección de la PCR en los niños clasificados con alta probabilidad de padecer TB fue del 67%, cifra mayor que la obtenida con el uso de las tinciones de ácido resistencia (39% utilizando Ziehl Neelsen y 42% utilizando Ziehl-Neelsen y auramina O) o con el empleo exclusivo del medio de Löwenstein Jensen (54%). Más aún, la tasa de detección de la PCR fue similar a la obtenida al utilizar la combinación de los tres medios de cultivo (71%). Al utilizar el cultivo como

método de referencia, la PCR tuvo una sensibilidad del 90.4%, una especificidad del 94.0%, un valor predictivo positivo de 89% y un valor predictivo negativo del 95% (12).

Los resultados obtenidos por la PCR podrían representar un gran avance en el diagnóstico temprano de la TB en la población co-infectada con VIH. La decisión de iniciar tratamiento antituberculoso en estos pacientes resulta difícil, ya que la sintomatología puede ser especialmente inespecífica. Otro tipo de enfermedades como las infecciones con el complejo *M. avium*, por citomegalovirus o linfomas pueden presentar signos y síntomas similares a los presentados por TB (6). Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos, son altamente específicos para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, además son de rápida ejecución, por lo que representan una excelente alternativa al compararse con los métodos convencionales, ya que reducen drásticamente el tiempo de diagnóstico de TB (6, 11, 31).

IV. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico adecuado de tuberculosis en el laboratorio ha adquirido importancia vital ya que muchos pacientes presentan un cuadro clínico confuso y atípico, principalmente en población inmunocomprometida.

Las técnicas convencionales de diagnóstico muchas veces no proporcionan los resultados en corto tiempo o no son lo suficientemente sensibles como para detectar al microorganismo. Por estas dificultades es necesario que el laboratorio clínico desarrolle técnicas sensibles y específicas que provean un diagnóstico rápido y eficiente para el control de esta enfermedad.

En el presente estudio se evaluó el desempeño de dos técnicas para la detección temprana de tuberculosis en pacientes infectados con VIH: la tinción auramina O y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) hemianidada IS6110. La primera de ellas ha probado poseer la misma sensibilidad que la técnica convencional de Ziehl-Neelsen, con la ventaja adicional de ser más rápida al utilizar un objetivo de bajo poder para la observación microscópica de los bacilos alcohol-ácido resistentes. La segunda técnica evaluada, un ensayo de PCR hemianidada IS6110, está dirigida a la secuencia de inserción IS6110, específica del genoma del complejo *Mycobacterium tuberculosis* permite su diferenciación de las infecciones con otras micobacterias. Además, su alta sensibilidad puede resultar de gran utilidad en el diagnóstico temprano de los pacientes que sufren de tuberculosis extrapulmonar, los cuales usualmente tienen

baciloscopía negativa/cultivo positivo. Lo anterior conllevaría a brindar resultados en menor tiempo que el requerido hasta ahora.

A través de este trabajo se evaluó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y la concordancia de la tinción auramina O y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) hemianidada IS6110, con el fin de proveer de nuevas herramientas diagnósticas rápidas, sensibles y específicas que contribuyan significativamente al manejo y tratamiento de la tuberculosis especialmente en la población inmunocomprometida, en la que dichas ventajas son mandatorias.

V. OBJETIVOS

A. Generales

Evaluar la exactitud y concordancia de las técnicas de PCR hemianidada IS6110 y la tinción auramina O a un nivel de confianza del 95% con respecto al cultivo de *M. tuberculosis* como método de referencia para el diagnóstico de tuberculosis en pacientes co-infectados con VIH.

B. Específicos

1. Estandarizar la técnica de PCR hemianidada IS6110 para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.
2. Estandarizar la tinción de auramina O para la detección de bacilos alcohol-ácido resistentes.
3. Evaluar las muestras clínicas provenientes de pacientes infectados con el VIH que acuden a la Clínica Familiar "Luis Ángel García" con diagnóstico presuntivo de TB a través de las técnicas de auramina O y PCR hemianidada IS6110.
4. Determinar la exactitud de las técnicas a través de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo.
5. Determinar la concordancia de las técnicas de tinción con auramina O, Ziehl-Neelsen y la técnica de PCR a un nivel de confianza del 95%.

VI. HIPÓTESIS

Por ser un estudio descriptivo, no es justificable la formulación de una hipótesis.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

Muestras biológicas recibidas en el Laboratorio de micobacterias y hongos del Hospital General "San Juan de Dios" de Guatemala a las que se les solicitó baciloscopía por Ziehl-Neelsen y cultivo. Los tipos de muestras que fueron incluidos en el estudio fueron esputos, médulas óseas, huesos, biopsias de tejido, líquidos cefalorraquídeos, orinas y secreciones. Las muestras provinieron de pacientes viviendo con VIH/SIDA que fueron atendidos en la Clínica Familiar "Luis Ángel García" en quienes clínicamente se sospechó tuberculosis.

B. Recursos

1. Humanos

a) Bachiller María Eugenia Castellanos Reynosa

b) Asesoras

- M.Sc. Blanca Samayoa
- Dra. Sonia Montenegro
- Licda. Rosario Hernández
- M.Sc. Ana María Xet Mull

c) Personal del Laboratorio de micobacterias y hongos del Hospital General "San Juan de Dios" de Guatemala

2. Institucionales

- a) Clínica Familiar "Luis Ángel García", Ciudad de Guatemala, Guatemala
- b) Laboratorio de micobacterias y hongos del Hospital General "San Juan de Dios" de Guatemala
- c) Laboratorio de Inmunogenética Molecular (MIL), Oschner Clinical Foundation, New Orleans, LA
- d) Laboratorio de Biología Molecular de la Asociación de Salud Integral (ASI)
- e) Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

3. Físicos

a) Técnica de PCR hemianidada IS6110

i) Equipo

- agitador vortex
- agitadores
- balanza analítica
- baño María a 37°C, 65°C y 95°C
- cámaras de electroforesis
- campanas de flujo laminar
- congelador a -70°C o a -20°C
- fuente de poder
- horno de microondas
- microcentrífugas
- refrigeradoras

- Sistema de documentación de geles: programa de software "KODAK 1D 3.6" y transiluminador de luz ultravioleta
- termociclador (Perkin Elmer)

ii) Reactivos

- agua ultrapura
- buffer para PCR 10X (Tris-HCl 100 mM, pH 8.3, KCl 500 mM)
- cloruro de magnesio (25 mM)
- dNTPs (1.25 mM de cada uno, 5mM total)
- cebador Pt8 (1 μ M): 5'-GTGCGGATGGTCGCAGAGAT-3'
- cebador Pt9 (1 μ M): 5'-GTGCGGATGGTCGCAGAGAT-3'
- cebador TB290 (1 μ M): 5'-GGCGGGACAACGCCGAATGCGAA-3'
- sulfato de amonio 160 mM
- taq polimerasa (5 U/ μ l)
- reactivo Taq Start (1.1 μ g/ μ l)
- rojo cresol 1 μ g/ μ l en 70% de glicerol
- etanol al 70%
- etanol al 100%
- isopropanol al 100%
- hipoclorito de sodio al 10%
- buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)
- buffer TE con 1% Triton X-100
- buffer TE con Triton X-100 1% y Chelex 5%
- Puregene™ DNA Isolation Kit (Gentra Systems)
- glicógeno (20 mg/ml)
- Solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1)

- acetato de sodio 3M, pH 5.2
- marcador de peso molecular de ADN
- agarosa
- agua destilada
- bromuro de etidio (1 mg/ml)
- buffer TAE 1 X (0.04 M Tris-acetato, pH 8.0, 0.001 M EDTA)

iii) Materiales

- bisturí
- bolsas rojas de bioseguridad
- cajas de Petri plásticas estériles
- cinta de color
- espátula
- gasa
- gradillas para tubos de microcentrífuga
- guantes
- hisopos de algodón
- lentes protectores contra luz UV
- magneto
- marcador permanente
- papel encerado
- papel absorbente (mayordomo)
- plástico para envolver
- parafilm
- peines para la cámara de electroforesis
- Cámara KODAK DC290
- pipetas plásticas
- pipetas de 1000, 200, 100, 20 y 10 μ l

- pissetas de 500, 250 ml
- probetas 1000 ml
- puntas de pipeta amarillas estériles
- puntas de pipeta azules estériles
- recipiente de descarte de soluciones infecciosas con hipoclorito de sodio al 10%
- recipiente para descarte de soluciones de fenol/cloroformo
- termómetro
- tijeras
- tubos de 0.5 ml para PCR estériles
- tubos de 1.5 ml estériles

iv) Cristalería

- varilla para agitación
- probetas de 100 ml, 250 y 1000 ml
- recipientes de vidrio limpios de 250, 500 ml y 1000 ml

v) Material biológico

- ADN humano (control interno)
- ADN de *Mycobacterium tuberculosis*
- cepas conocidas de *M. tuberculosis* (control positivo)
- muestras clínicas con cultivo positivo y/o negativo para *Mycobacterium* sp. (controles positivos y negativos respectivamente)

b) Tinción de auramina O

i) Equipo

- microscopio de fluorescencia
- balanza analítica
- mechero Bunsen
- bandeja para tinción

ii) Reactivos

- auramina O
- cristales de fenol
- ácido clorhídrico concentrado
- etanol al 95%
- etanol al 70%
- permanganato de potasio
- agua destilada
- aceite mineral
- estándar de MacFarland No. 1

iii) Materiales

- cinta adhesiva
- espátula
- guantes
- papel filtro
- papel absorbente (mayordomo)
- palillos de madera
- láminas porta objetos
- cajas para guardar láminas

iv) Cristalería

- embudo

- recipientes de vidrio ámbar de 500, 1000 ml
- probetas de 1000, 250 ml
- matraces volumétricos
- pipetas volumétricas
- pisetas de 250 ml

v) Material biológico

- cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*
- cultivo de *Escherichia coli*
- muestras de esputo positivas y negativas para BAAR

C. Procedimiento

1. Recolección y tratamiento de las muestras

- a) Se recolectaron las muestras recibidas en el Laboratorio de micobacterias y hongos del Hospital General "San Juan de Dios" de Guatemala a las que se les solicitó baciloscopía por Ziehl-Neelsen y cultivo. Estas muestras consistieron en esputos, médulas óseas, biopsias de tejido, biopsias de hueso, secreciones y orinas. Se incluyeron también líquidos cefalorraquídeos, aún cuando a los mismos sólo se les realizó cultivo y no tinción de Ziehl Neelsen.
- b) Se realizó un frote de cada una de las muestras (con excepción de los líquidos cefalorraquídeos) para la tinción con auramina O.
- c) Las muestras provenientes de sitios no estériles fueron procesadas por el método de digestión y decontaminación del N-acetil-L-cisteína-NaOH (42). Estas muestras, junto con aquellas provenientes de sitios estériles, se guardaron en alícuotas a -20°C para su análisis posterior con la técnica de PCR.

2. Preparación de la muestra y extracción del ADN de *Mycobacterium tuberculosis* para PCR (Metodología detallada en Anexos 1-6)

- a) Debido a la diversidad de muestras se realizaron diferentes métodos de extracción de ADN: En el caso de los esputos, orinas y secreciones la extracción consistió básicamente en tratamiento de la muestra con detergente y calor (Anexos 1 y 2). El ADN de los líquidos cefalorraquídeos fue extraído por el método de fenol/cloroformo (Anexo 3). Se utilizó un Kit comercial (Gentra Systems) para la extracción del ADN de los tejidos y médulas óseas (Anexos 4-6).
- b) A cada muestra se le realizó un control interno (β -globina) de amplificación de ADN antes de realizar el ensayo del N2-PCR en un tubo.
- c) Únicamente las muestras que demostraron poseer ADN amplificable por el control interno fueron tomadas en cuenta para la técnica de N2-PCR en un tubo.

3. Técnica de PCR Hemianidada IS6110 (Metodología detallada en Anexo 7)

- a) Se realizó la técnica de PCR hemianidada utilizando tres cebadores específicos para la secuencia de inserción IS6110. Los cebadores externos Pt8 y Pt9 para la primera amplificación y los cebadores internos TB290 y Pt9 para la segunda amplificación (43). La metodología realizada fue desarrollada a partir de la modificación de la técnica N2-PCR hemianidada (12, 43 ,44) utilizando un solo

tubo para la reacción. El presente estudio es el primero que evalúa el rendimiento de esta técnica modificada.

- b) La mezcla de reacción (mezcla maestra) contenía 62.5 μM de cada uno de los dNTPs, 0.20 μM del cebador Pt8, 0.57 μM del cebador Pt9, 0.50 μM del cebador TB290, 2mM de MgCl_2 , 16 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.75 U de Taq polimerasa con Taq Start y 1 μg de rojo cresol/10 μl de mastermix (Montenegro SH, 2004. Pendiente de publicación). A 10 μl de mezcla de reacción se le agregó 3 μl de muestra. Esto se amplificó y el producto amplificado se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Un producto de 337 pares de bases debió ser observado en el transiluminador de luz ultravioleta para considerar como positiva a la muestra (43).

4. Tinción de auramina O (Metodología detallada en Anexos 8 y 9)

- a) Se estandarizó la tinción de auramina O con el fin de encontrar los tiempos de tinción más prácticos y adecuados.
- b) Se tiñeron las muestras clínicas recolectadas utilizando los tiempos de tinción determinados en la estandarización.
- c) Se observaron los frotos teñidos en microscopio de fluorescencia con objetivo de 40X. Las micobacterias se tiñen de color amarillo a naranja, con su morfología típica de bacilos delgados con forma de barra (pueden presentarse curvos) de aproximadamente 1 a 10 μm (30). La cantidad de bacilos alcohol-ácido resistentes observados se

reportó de acuerdo a la tabla propuesta para la observación de tinciones con fluorocromos con una magnificación de 450X (Anexo 9, literal E).

5. Obtención de resultados de tinción Ziehl-Neelsen y cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

- a) Las muestras fueron procesadas de forma rutinaria por el personal del Laboratorio de micobacterias y hongos del Hospital General "San Juan de Dios" de Guatemala. Estas se tiñeron con Ziehl-Neelsen y fueron cultivadas en el medio de Löwenstein Jensen (Sistema BACTEC ® en el caso de las médulas óseas). Los resultados utilizados en esta investigación fueron los reportados por el personal del laboratorio. La forma de reporte de los resultados con la tinción de Ziehl Neelsen fue acorde a la Comisión Nacional de tuberculosis (Anexo 10).
- b) El presente estudio conllevó un análisis ciego de las muestras. Los resultados obtenidos de la tinción en Ziehl-Neelsen y el cultivo fueron enmascarados para el investigador, y sólo le fueron proporcionados por el Jefe del Laboratorio de micobacterias y hongos para realizar el análisis de los datos.

D. Análisis de datos

1. Tipo de estudio: prospectivo, transversal, descriptivo.
2. Tamaño de la muestra: Un mínimo de 100 muestras de fluidos biológicos provenientes de pacientes que asistieron a la Clínica Familiar "Luis Ángel García" del Hospital General San Juan de Dios para la evaluación de

cada una de las técnicas (Ziehl Neelsen, auramina O, PCR) con respecto al cultivo. El muestreo fue por intención de tipo no probabilístico.

3. Análisis estadístico: Los resultados fueron almacenados en una base de datos creado con el programa Epi info 6. Los indicadores calculados fueron: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y el valor *Kappa* para las técnicas de tinción con auramina O, Ziehl-Neelsen y la técnica de PCR a un nivel de confianza del 95%. Los indicadores utilizados fueron calculados con base a las muestras y no a los pacientes incluidos en el estudio. El método de referencia fue el cultivo de *M. tuberculosis* (Cálculo de los indicadores en Anexos 11 y 12).

VIII. RESULTADOS

Durante el período del 3 de septiembre al 5 diciembre del 2003 se colectaron en el laboratorio de TB y hongos del HGSJDD 142 muestras

provenientes de 94 pacientes viviendo con VIH. La mayor proporción de muestras fueron esputos, seguido por médulas óseas y biopsias de hueso (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de los distintos tipos de muestra colectadas (N=142).

Tipo de muestra	n	%
Esputo	44	31.0
Médula ósea	33	23.2
Biopsias de hueso	25	17.6
Líquido cefalorraquídeo	19	13.4
Tejidos	9	6.3
Orina	6	4.2
Secreciones	6	4.2

Tanto el ensayo de PCR hemianidado IS6110 y la tinción auramina O fueron estandarizados antes de la evaluación de las muestras del estudio. Los resultados de las estandarizaciones para ambas técnicas se presentan a continuación.

1. Estandarización de la técnica de PCR hemianidada IS6110 (modificada)

La técnica de PCR hemianidada IS6110 utilizada fue una modificación de la técnica N2-PCR desarrollada por Montenegro *et al.* empleando un solo tubo para la amplificación (43, 12, 44). En la Figura 1a se presenta una electroforesis en gel de los productos de amplificación de ADN de *M. tuberculosis* (MTB) a diferentes concentraciones (7.5 pg - 0.5fg) en la que se compara al N2-PCR modificado (carriles superiores) con el N2-PCR original (carriles inferiores); se observó que ambas técnicas presentaron la misma sensibilidad, con bandas fuertes y definidas aún con bajas concentraciones de ADN micobacteriano, aunque el N2-PCR modificado presentó menos bandas inespecíficas. En la Figura 1b se observa el rendimiento de la técnica de N2-PCR modificada para la detección de ADN y cepas de MTB, así como para muestras clínicas positivas y negativas. Se consideró positiva una muestra que amplificara una banda de 337 pb correspondiente a la secuencia blanco en el ADN de *M. tuberculosis*. Con excepción de las diluciones mayores de ADN y

una cepa de MTB, los resultados obtenidos para esta técnica fueron los esperados, obteniéndose bandas de 337 pb en las muestras positivas para TB y no apareciendo bandas a ese tamaño en las muestras negativas.

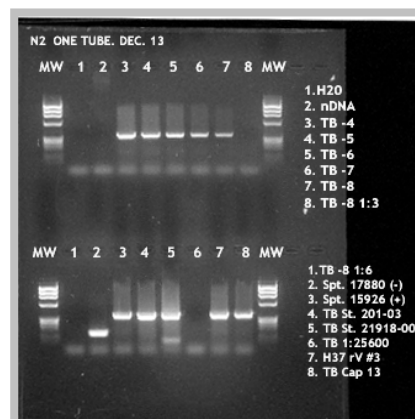


Fig.

1a.

Electroforesis en gel de productos de PCR de ADN de *M. tuberculosis* (337 pb). Fila superior corresponde a N2-PCR modificado, fila inferior a N2-PCR original. MW: marcador de peso molecular, 1: agua, 2: ADN humano (control negativo), 3-10: ADN de *M. tuberculosis* a distintas concentraciones (datos aproximados).

Fig. 1b. Electroforesis en gel de productos del N2-PCR modificado (337 pb). Fila superior: MW: marcador de peso molecular. 1: agua, 2: ADN humano (control negativo), 3-8: ADN de *M. tuberculosis* a distintas concentraciones, (Aprox. desde 7.5^{-4} pg a 2.5^{-8} pg). Fila inferior: MW: marcador de peso molecular, 1: ADN MTB (1.25^{-8} pg), 2: Esputo negativo a MTB, 3: Esputo positivo a MTB, 4-8: Cepas de MTB.

A las muestras del estudio se les realizó un control interno de amplificación de ADN humano (β -globina) previo a su análisis con N2-PCR modificado. Este control se realizó con la intención de detectar ADN humano y evaluar el proceso de extracción y/o la calidad del ADN extraído.

En la tabla 2 se observa que el 100% de los líquidos cefalorraquídeos y el 88% de los esputos demostraron ADN amplificable. Las médulas óseas y orinas presentaron menos capacidad de amplificación.

Tabla 2. Porcentaje de muestras con amplificación a β -globina humana (N=108)¹.

Tipo de muestra (n)	# positivos	% muestras que amplificaron β -globina
Esputos (42)	37	88.1
Aspirados de médulas óseas (31)	2	6.4
Líquidos cefalorraquídeos (17)	17	100.0
Biopsias de tejido (9)	4	44.4
Orinas (5)	0	—
Secreciones (4)	2	50.0
Total (108)	62	57.4

¹ Ensayo no realizado para biopsias de hueso.

En las Figuras 2 y 3 se observan las electroforesis en gel de los productos de amplificación para el control interno (β -globina), de algunos esputos y médulas óseas respectivamente. Se apreció la enorme diferencia entre el número de muestras con ADN amplificable de los esputos con respecto a las médulas óseas.

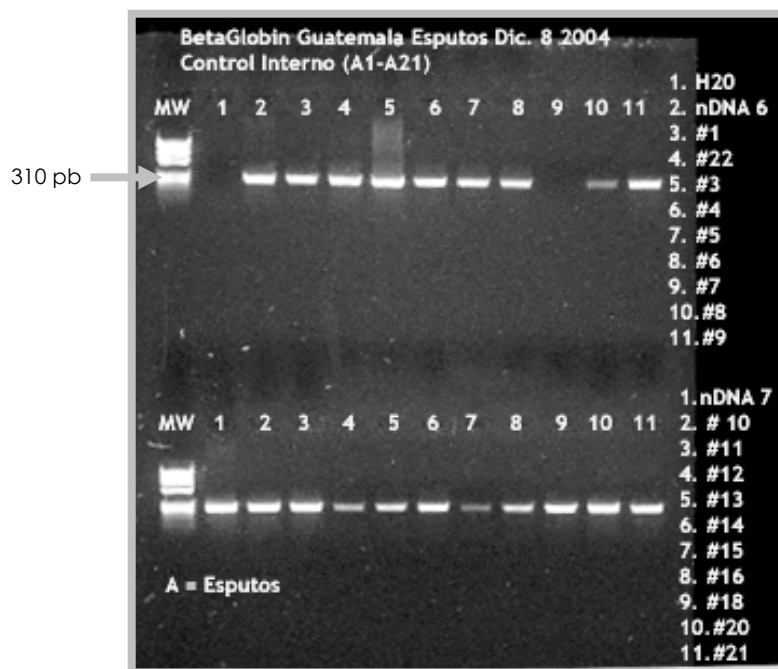
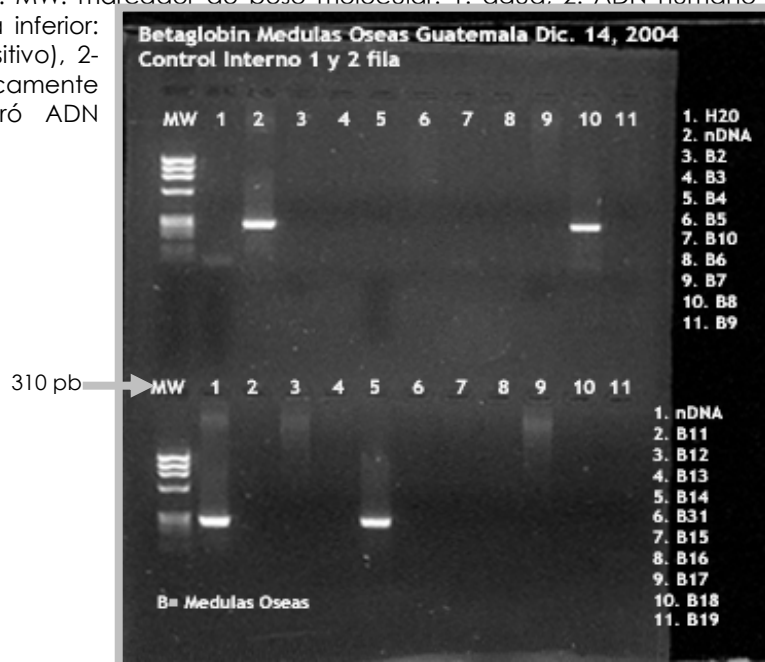


Fig. 2. Electroforesis en gel de productos de PCR del control interno (β globina) en esputos (268 pb). Fila superior: MW: marcador de peso molecular. 1: aava. 2: ADN humano (control positivo), 3-11: esputos. Fila inferior: (control positivo), 2- que únicamente no demostró ADN



1: ADN humano 11: esputos. Notar esputo #7 (pozo 9) amplificable.

Fig. 3. Electroforesis en gel de productos de PCR del control interno (β globina) en médulas óseas (268 pb). Fila superior: MW: marcador de peso molecular. 1: agua, 2: ADN humano (control positivo), 3-11: médulas óseas. Fila inferior: 1: ADN humano (control positivo), 2-11: médulas óseas. Notar que únicamente B8 y B14 demostraron ADN amplificable.

2. Estandarización de la tinción de auramina O.

Los tiempos de tinción de auramina O fueron estandarizados con el objetivo de observar bacilos alcohol-ácido resistentes (BAAR) fluorescentes, con un fondo de contraste adecuado y con la menor cantidad de artefactos.

Se utilizó como base de la estandarización los tiempos de tinción recomendados en el Manual de Procedimientos de Microbiología Clínica de la Sociedad Americana de Microbiología (30), que sugieren tiempos de 15 minutos de auramina O, seguido de 2 minutos con alcohol-ácido 0.5% y finalmente 2 minutos con permanganato de potasio al 0.5% como colorante de contraste (15'2'2).

Se realizaron frotis de una muestra de esputo positiva para BAAR y se trabajó en los siguientes tiempos de tinción: 15'2'1, 15'2'2, 15'2'3, 20'2'1, 20'2'2, 20'2'3, 25'2'1, 25'2'2 y 25'2'3. Los mejores resultados fueron obtenidos con los tiempos de tinción de 20'2'2 y 25'2'2. Entre estos dos tiempos se decidió elegir los tiempos de 20'2'2 por consumir menos tiempo.

Con ellos se observaron BAAR amarillo-verdosos con muy buena fluorescencia y muy buen fondo negro.

3. Comparación de los métodos evaluados.

Las muestras del estudio fueron analizadas utilizando la tinción de Ziehl Neelsen (ZN), auramina O (AO), N2-PCR modificado y cultivo. En la tabla 3 se presentan los resultados positivos obtenidos para cada tipo de muestra y técnica evaluada. El mayor porcentaje de positividad se observó con la técnica de N2-PCR modificado (38.7%), seguido por el cultivo (11.0%) y AO (9.6%). El menor porcentaje de positividad correspondió a la tinción de ZN (2.4%). Cinco muestras fueron excluidas por presentar resultado “dudoso” con la tinción de AO, ya que solamente se observaron 1-2 BAAR/frote. En once muestras el cultivo fue reportado como contaminado.

Tabla 3. Resultados positivos por muestra y ensayo diagnóstico para TB (N=142).

Técnica Espécimen (n)	Ziehl Neelsen ¹	Auramina O ²	Cultivo ³	N2-PCR modificado ⁴
	n positivos (%)	n positivos (%)	n positivos (%)	n positivos (%)
Espustos (44)	2/44 (4.5)	4/39 (10.3)	1/38 (2.6)	12/37 (32.4)
Aspirados de médulas óseas (33)	0/33 (0)	2/31 (6.4)	7 /33 (21.2)	0/2 (0)
Biopsias de hueso (25)	0/25 (0)	2/24 (8.3)	2/21 (9.5)	N/D ⁵
Líquidos cefalorraquídeos (19)	N/D ⁵	N/D ⁵	1/18 (5.6)	10/17 (58.8)

Biopsias de tejido (9)	1/9 (11.1)	2/9 (22.2)	1/8 (12.5)	2/4 (50.0)
Otros (12) (Orinas y secreciones)	0/12 (0)	1/11 (9.1)	2/9 (22.2)	0/2 (0)
Total (142)	3/123 (2.4)	11/114 (9.6)	14/127 (11.0)	24/62 (38.7)

¹ El total de muestras observado fue de 123, no se incluyen los 19 LCRS, ya que rutinariamente este tipo de muestras no se observan por medio de esta técnica en el laboratorio de TB y Hongos del HGSJDD.

² No se observaron los 19 LCRs, al igual que dos esputos y una orina. Además, una MO tuvo un resultado inconcluso por ser un frote demasiado grueso y en 5 muestras (3 esputos, 1 médula ósea y 1 biopsia de hueso) se observaron de 1-2 BAAR/frote, lo que se considera un resultado "dudoso".

³ A 4 muestras no se les realizó el cultivo: 1 esputo, 1 orina y 2 secreciones; además en 11 muestras (5 esputos, 4 biopsias de hueso, 1 biopsia de tejido y 1 LCR) el cultivo fue reportado como contaminado.

⁴ No se incluyeron a las 25 biopsias de hueso por cuestiones logísticas y 9 muestras (2 esputos, 2 MO, 2 LCRS, 1 orina, 2 secreciones), fueron insuficientes para la PCR. Finalmente, no se obtuvo ADN amplificable como se explicó anteriormente para 46 muestras, por lo que en total 62 muestras tienen resultado final para PCR.

⁵ Ensayo no realizado para este tipo de muestra.

Para comparar los resultados de cada uno de los ensayos diagnósticos empleados se realizó un análisis de la exactitud (sensibilidad, especificidad, VPP y VPN) y concordancia de las técnicas de ZN, AO y N2-PCR modificado con respecto al cultivo (en Löwenstein-Jensen y BACTEC®). La sensibilidad de N2-PCR modificado fue óptima (100.0%) comparada con 27.3% de AO y 15.4% de ZN. Inversamente, la mejor especificidad la presentó ZN (99.0%), seguido de la AO (92.5%) y N2-PCR modificado (72.5%). El valor predictivo positivo del ZN fue el mayor (66.7%), comparado con el de la AO (30.0%) y el N2-PCR modificado (17.6%). El valor predictivo negativo para todas las técnicas fue mayor del 90%, siendo de 100.0% para N2-PCR modificado, 95.4% para AO y 94.5% para el ZN. El grado de concordancia entre las técnicas y el cultivo fue sufrible para ZN y N2-PCR modificado (0.215 y 0.227 respectivamente) y pobre con 0.206 para AO (Interpretación del valor *Kappa* en Anexo 12). Los amplios intervalos de

confianza observados se debieron principalmente a la escasa cantidad de muestras positivas obtenidas y a la alta discrepancia entre las técnicas. Estos resultados se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Exactitud y concordancia de las técnicas de Ziehl Neelsen, auramina O y N2-PCR modificado con respecto al cultivo (N= 142)¹.

Técnica	Ziehl Neelsen (109)	Auramina O (104)	N2-PCR modificado (54) ²
Indicador	% (IC 95%) ³	% (IC 95%)	% (IC 95%)
Sensibilidad	15.4 (2.7-46.3)	27.3 (7.3-60.7)	100.0 (31.0-100.0)
Especificidad	99.0 (93.5-99.9)	92.5 (84.6-96.7)	72.5 (58.0-83.7)
VPP ⁴	66.7 (12.5-98.2)	30.0 (8.1-64.6)	17.6 (4.7-44.2)
VPN ⁵	89.6 (81.8-94.5)	91.5 (83.4-96.0)	100.0 (88.3-100.0)
<i>Kappa</i> ⁶	0.2149 Sufrible	0.2057 Pobre	0.2270 Sufrible

¹ Se incluyen todos los tipos de muestras; sin embargo algunos "n" no coinciden por las razones previamente expuestas (procedimientos no realizados, contaminación de cultivos, muestras sin ADN amplificable, etc.). Esta aseveración se aplica también para todas las tablas siguientes

² Se eliminaron del cálculo 4 muestras provenientes de pacientes con tratamiento antifímico en el momento de la toma de muestra.

³IC 95% = Intervalo de confianza al 95%. ⁴ VPP = Valor predictivo positivo. ⁵ VPN = Valor predictivo negativo. Los VPP y VPN fueron calculados con base a las muestras y no a los pacientes del estudio.

⁶ *Kappa* = Coeficiente *Kappa* (concordancia).

En la tabla 5 se observan la exactitud y concordancia de las técnicas estudiadas con respecto al cultivo en medio Löwenstein-Jensen excluyendo a las médulas óseas ya que estas muestras fueron cultivadas en medio líquido (botellas BACTEC ®). En el caso de la PCR los valores permanecieron casi inalterables ya que únicamente dos médulas óseas se incluyeron en el análisis anterior. La sensibilidad para las técnicas de ZN y

AO aumentó casi el doble, alcanzando valores de 33.3% y 50% respectivamente. Con respecto a la especificidad y los valores predictivos negativos ambas técnicas permanecieron con valores similares aunque el valor predictivo positivo de la AO se incrementó ligeramente. Al excluir a las médulas óseas, el grado de concordancia del ZN y la AO con respecto al cultivo todavía resultó regular y sufrible, respectivamente.

Tabla 5. Exactitud y concordancia de las técnicas de Ziehl Neelsen, auramina O y N2-PCR modificado con respecto al cultivo en Löwenstein Jensen (N= 109).

Técnica	Ziehl Neelsen (76) % (IC 95%) ²	Auramina O (73) % (IC 95%)	N2-PCR modificado (52) ¹ % (IC 95%)
Sensibilidad	33.3 (6.0-75.9)	50.0 (13.9-86.1)	100.0 (31.0-100.0)
Especificidad	98.6 (91.2-99.9)	92.5 (82.7-97.2)	71.4 (56.5-83.0)
VPP ³	66.7 (12.5-98.2)	37.5 (10.2-74.1)	17.6 (4.7-44.2)
VPN ⁴	94.5 (85.8-98.2)	95.4 (86.2-98.8)	100.0 (87.7-100.0)
<i>Kappa</i> ⁵	0.4136 Regular	0.3693 Sufrible	0.2239 Sufrible

¹ Se eliminaron del cálculo 4 muestras provenientes de pacientes con tratamiento antifímico en el momento de la toma de muestra.

²IC 95% = Intervalo de confianza al 95%. %. ³ VPP = Valor predictivo positivo. ⁴VPN = Valor predictivo negativo. Los VPP y VPN fueron calculados con base a las muestras y no a los pacientes del estudio.

⁵*Kappa* = Coeficiente *Kappa* (concordancia).

Cuando el análisis de exactitud y concordancia se realizó sólo sobre las muestras de esputo (Tabla 6), las tres técnicas rindieron al máximo en sensibilidad y valor predictivo negativo (100%), mientras que ZN presentó la mejor especificidad y valor predictivo positivo (97.3% y 50.0%) comparado

con AO (91.2% y 25.0%) y N2-PCR modificado (80.0% y 14.3%). Además la técnica de ZN presentó una buena concordancia con respecto al cultivo, mientras que la PCR presentó la menor concordancia al comparar las tres técnicas.

Tabla 6. Exactitud y concordancia de las técnicas de Ziehl Neelsen, auramina O y N2-PCR modificado con respecto al cultivo en esputos (N=44).

Técnica	Ziehl Neelsen (38) % (IC 95%) ²	Auramina O (35) % (IC 95%)	N2-PCR modificado (31) ¹ % (IC 95%)
Sensibilidad	100.0 (5.5-100.0)	100.0 (5.5-100.0)	100.0 (5.5-100.0)
Especificidad	97.3 (84.2-99.9)	91.2 (75.2-97.7)	80.0 (60.9-91.6)
VPP ³	50.0 (2.7-97.3)	25.0 (1.3-78.1)	14.3 (0.8-58.0)
VPN ⁴	100.0 (88.0-100.0)	100.0 (86.3-100.0)	100.0 (82.8-100.0)
<i>Kappa</i> ⁵	0.6545 Buena	0.3713 Sufrible	0.2051 Pobre

¹ Se eliminaron del cálculo 3 muestras provenientes de pacientes con tratamiento antifímico en el momento de la toma de muestra.

² IC 95% = Intervalo de confianza al 95%. ³ VPP = Valor predictivo positivo. ⁴ VPN = Valor predictivo negativo. Los VPP y VPN fueron calculados con base a las muestras y no a los pacientes del estudio.

⁵*Kappa* = Coeficiente *Kappa* (concordancia).

Con respecto al procedimiento de amplificación, en la Figura 4 se observan las bandas obtenidas por el N2-PCR modificado en muestras de esputo. Las muestras positivas presentaron la banda de 337 pares de bases esperada, generalmente clara y gruesa, lo que indicó franca amplificación del ADN blanco.

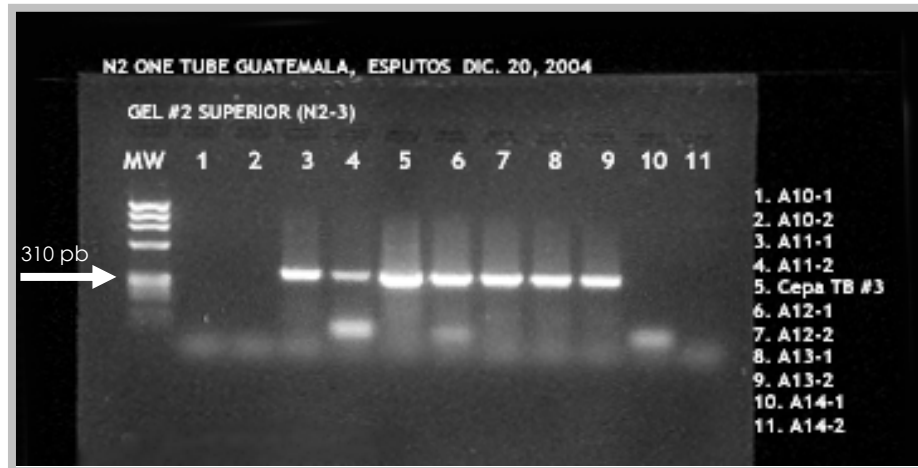


Fig. 4. Electroforesis en gel de productos del N2-PCR modificado (337 pb) en muestras de esputo (por duplicado). Fila superior: MW: marcador de peso molecular, 1-2 y 10-11 esputos negativos, 3-4 y 6-9: esputos positivos, 5: Control positivo (cepa MTB).

El análisis de exactitud y concordancia no se pudo realizar sobre las médulas óseas porque ninguna de las muestras en las que el cultivo detectó *Mycobacterium* sp. demostró un resultado positivo por las técnicas de ZN y/o AO. Dos muestras fueron positivas por AO pero con resultado de cultivo negativo, lo que condujo a una mala concordancia entre ambas técnicas. En el caso del N2-PCR modificado no hay resultados de exactitud y concordancia porque únicamente 2 médulas óseas demostraron poseer ADN amplificable para la realización de esta técnica.

Al evaluar el desempeño de la técnica de la PCR en 15 líquidos cefalorraquídeos respecto al cultivo, la sensibilidad y el valor predictivo negativo fueron de 100.0%, la especificidad de 50.0% y el valor predictivo positivo del 12.5%. Para este análisis se eliminó del cálculo una muestra con resultado de PCR positivo/cultivo negativo por provenir de un paciente con tratamiento antifímico.

En la Figura 5 se observan las bandas obtenidas por el N2-PCR modificado en muestras de líquido cefalorraquídeo. Las muestras positivas presentaron la banda de 337 pares de bases esperada (independientemente de la intensidad de la banda observada).

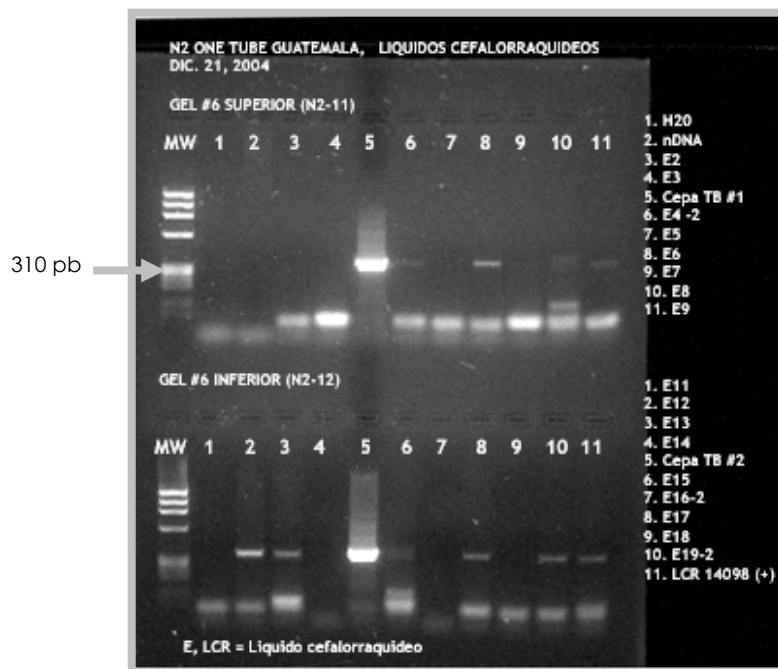


Fig. 5. Electroforesis en gel de productos del N2-PCR modificado (337 pb) en líquidos cefalorraquídeos. Fila superior: MW: marcador de peso molecular, 1: agua, 2: ADN humano (control negativo), 3-4, 7, 9: LCRs negativos, 5: Control positivo (cepa MTB), 6, 8, 10-11: LCRs positivos. Fila inferior: MW: marcador de peso molecular, 1, 4, 7, 9: LCRs negativos, 5: Control positivo (cepa MTB), 2-3, 6, 8, 10 LCRs positivos, 11: LCR conocido positivo.

En el caso de las biopsias de hueso (Tabla 7), la AO presentó mejores resultados de exactitud y concordancia con respecto al cultivo que la tinción de ZN porque la última no reconoció a ninguna de las dos muestras que tuvieron un cultivo positivo. La AO detectó adecuadamente una de dos muestras positivas (sensibilidad 50.0% y especificidad 100.0%). La concordancia entre AO y cultivo para este tipo de muestras fue bueno

(0.6441). Por el contrario, la ausencia de datos en ZN impidió establecer los parámetros antes mencionados para esta tinción con respecto a las biopsias de hueso.

Tabla 7. Exactitud y concordancia de las técnicas de Ziehl Neelsen, auramina O con respecto al cultivo en biopsias de hueso (N=25).

Técnica	Ziehl Neelsen (21) % (IC 95%) ¹	Auramina O (21) % (IC 95%)
Sensibilidad	ND ⁵	50.0 (2.7-97.3)
Especificidad	ND	100.0 (79.1-100.0)
VPP ²	ND	100.0 (5.5-100.0)
VPN ³	ND	95.0 (73.1-99.7)
<i>Kappa</i> ⁴	ND	0.6441 Buena

¹IC 95% = Intervalo de confianza al 95%. ² VPP = Valor predictivo positivo. ³ VPN= Valor predictivo negativo. Los VPP y VPN fueron calculados con base a las muestras y no a los pacientes del estudio. ⁴*Kappa* = Coeficiente *Kappa* (concordancia). ⁵ND =No hay datos, ninguna muestra fue positiva por la técnica evaluada.

En la tabla 8 se detalla el análisis de exactitud y concordancia de las técnicas evaluadas con respecto al cultivo en muestras de tejido. Tanto para AO como PCR se observó un 100.0% de sensibilidad, resultado similar al del ZN; sin embargo esta última técnica presentó una especificidad y un valor predictivo positivo del 100.0%, valores mayores que los de AO y PCR. Los valores predictivos negativos para todas las técnicas fueron óptimos (100.0%).

Tabla 8. Exactitud y concordancia de las técnicas de Ziehl Neelsen, auramina O y N2-PCR modificado con respecto al cultivo en biopsias de tejidos (N=9).

Técnica	Ziehl Neelsen (8) % (IC 95%) ¹	Auramina O (8) % (IC 95%)	N2-PCR modificado (4) % (IC 95%)
Indicador			
Sensibilidad	100.0 (5.5-100.0)	100.0 (5.5-100.0)	100.0 (5.5-100.0)
Especificidad	100.0 (56.1-100.0)	85.7 (42.0-99.2)	66.7 (12.5-98.2)
VPP ²	100.0 (5.5-100.0)	50.0 (2.7-97.3)	50.0 (2.7-97.3)
VPN ³	100.0 (56.1-100.0)	100.0 (51.7-100.0)	100.0 (19.8-100.0)
<i>Kappa</i> ⁴	1.0000 Perfecta	0.6000 Regular	0.5000 Regular

¹IC 95% = Intervalo de confianza al 95%. ² VPP = Valor predictivo positivo. ³ VPN= Valor predictivo negativo. Los VPP y VPN fueron calculados con base a las muestras y no a los pacientes del estudio. ⁴*Kappa* = Coeficiente *Kappa* (concordancia).

Además, en la Figura 6 se presenta el resultado de la electroforesis en gel de las muestras de tejido evaluadas por N2-PCR modificado. Las muestras positivas presentaron la banda de 337 pares de bases esperada, generalmente clara y gruesa, demostrando franca amplificación del ADN blanco.



Fig. 6. Electroforesis en gel de productos del N2-PCR modificado (337 pb) en muestras de tejido. MW: marcador de peso molecular. 1-3: tejidos positivos, 5: Control positivo (cepa MTB),

Con respecto a las orinas y secreciones, la tinción de auramina O no detectó la presencia de BAAR en dos muestras de este tipo que presentaron un cultivo positivo, y detectó como positivas a dos muestras que tuvieron un resultado de cultivo negativo. De esta manera, AO presentó un 0.0% de sensibilidad y un nivel malo de concordancia. ZN y PCR no detectaron muestras positivas, por lo que no pudieron obtenerse los indicadores de exactitud y concordancia.

En la tabla 9 se presenta un análisis de la concordancia global, AO y PCR presentaron la mejor concordancia (0.4000, sufrible), seguidos por AO y ZN (0.2549, sufrible). La peor combinación resultó ser ZN y PCR (0.1410, pobre). Resultados análogos se observaron al evaluar la concordancia obtenida por estas técnicas para muestras de esputo. En el caso de los tejidos el grado de concordancia fue mayor para las tres técnicas, siendo perfecto para AO y PCR (1.00), bueno para ZN y AO (0.6087) y regular para ZN y PCR (0.5000); sin embargo, fueron muy pocas las muestras de tejido evaluadas.

Tabla 9. Coeficientes *Kappa* entre ZN, auramina O y N2-PCR modificado.

Indicador Combinación Técnicas	<i>Kappa</i> ¹ Global (n)	<i>Kappa</i> Espotos (n)	<i>Kappa</i> Tejidos (n)
ZN y AO	0.2549 Sufrible (114)	0.2844 Sufrible (39)	0.6087 Buena (9)
ZN y N2-PCR modificado	0.1410 Pobre (45)	0.0553 Pobre (37)	0.5000 Regular (4)
AO y N2-PCR modificado	0.4000 Sufrible (42)	0.3131 Sufrible (34)	1.0000 Perfecta (4)

¹*Kappa* = Coeficiente *Kappa* (concordancia 95%).

4. Caracterización de las muestras con Resultados de PCR y AO positivos y discrepantes con el cultivo.

Al analizar los resultados obtenidos se encontró que de las veinticuatro muestras en las que se amplificó la banda esperada por PCR, tres demostraron la presencia de *Mycobacterium* sp. por cultivo (1 esputo, 1 tejido y 1 LCR).

Las restantes veintiún muestras (11 esputos, 9 LCRs y 1 tejido) presentaron resultados discrepantes entre la PCR y el cultivo. Dieciocho presentaron un resultado de cultivo negativo, dos un cultivo contaminado y en un LCR creció *C. neoformans* en el medio de Löwenstein Jensen (cultivo reportado como contaminado).

En la tabla 10 se resumen las posibles causas del resultado de PCR para estas muestras (mayor detalle en Anexos 13-14). Uno de los LCRs compartió dos características, ya que en éste se aisló *C. neoformans* y perteneció a un paciente que en el momento de la toma de muestra se

encontraba bajo tratamiento para TB. Por aparte, un mismo paciente presentó dos muestras discrepantes, tejido y esputo.

Tabla 10. Caracterización de las muestras con resultados de PCR positivo/cultivo sin aislamiento para *Mycobacterium* sp. (n=21).

Características	Esputos (n = 11)	LCR (n =9)	Tejido (n=1)
Tuberculosis bajo tratamiento	3	2 ¹	0
Alta impresión clínica de TB, dejándole tratamiento día toma de muestra	2	0	0
Tuberculosis previa	1	0	0
Cultivo contaminado	2	0	0
Se aisló de muestra <i>C. neoformans</i>	0	3	0
Resultado de patología sugestivo de TB	0	0	1

¹ Uno de estos pacientes con mala adherencia al tratamiento.

En el caso de la AO, once muestras fueron positivas para esta técnica, de las cuales solamente tres fueron positivas para cultivo (1 esputo y 1 biopsia de hueso del mismo paciente y 1 tejido). De las restantes ocho muestras, siete presentaron un resultado de AO positivo/cultivo negativo. Una muestra (biopsia de hueso) presentó cultivo contaminado.

En la tabla 11 se resumen las posibles causas del resultado de AO para estas muestras (mayor detalle en Anexo 15). Un mismo paciente presentó dos muestras discrepantes, una muestra extrapulmonar (tejido) y un esputo, ambos PCR positivo (datos presentados anteriormente).

Tabla 11. Caracterización de las muestras con resultados de AO positivo/cultivo sin aislamiento para *Mycobacterium* sp. (n=8).

Características	Esputos (n = 3)	Muestras extrapulmonares
-----------------	-----------------	--------------------------

		(n = 5)
Resultado de PCR positivo	2	1 ¹
Tuberculosis previa	0	1
Cultivo contaminado, cultivo de muestra en medio líquido positivo a <i>Mycobacterium</i> sp. ²	0	1

¹ De las cinco muestras extrapulmonares, solamente a una se le pudo realizar el N2-PCR modificado.

² Se confirmó resemebrando gotas del cultivo líquido en medio de Löwenstein-Jensen.

5. Caracterización de las muestras con Resultados de AO “dudosos”.

En la tabla 12 se expone brevemente la caracterización de los pacientes que brindaron las cinco muestras con resultado “dudoso” (1-2 BAAR/frote) en la tinción de auramina O (mayor detalle en Anexo 16). Estas muestras (3 esputos, 1 biopsia de hueso y 1 médula ósea) fueron excluidas de los cálculos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN debido a que no pudieron ser clasificadas como positivas o negativas. Una de las muestras extrapulmonares (biopsia de hueso) compartió dos características, ya que en ésta existió una alta impresión clínica de TB y perteneció a un paciente que presentó un cultivo contaminado.

Tabla 12. Caracterización de las muestras con resultados de AO dudoso (n=5).

Paciente	Muestra	ZN	Cultivo	PCR	Observaciones
1	MO	Negativo	Positivo	No realizado	
2	Espuito	Negativo	Negativo	Positivo	Paciente con tratamiento antifímico en momento toma de muestra
3	Biopsia de hueso	Negativo	Contaminado	No realizado	Alta impresión clínica de TB, dejándole tratamiento día toma de muestra
4	Espuito 1	Negativo	Negativo	Positivo	
5	Espuito	Negativo	Contaminado	Inconcluso	

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó el desempeño de dos técnicas para la detección temprana de tuberculosis en pacientes infectados con VIH: la tinción auramina O y un ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) IS6110 de tipo hemianidada (N2-PCR modificado) con respecto a las técnicas tradicionales o regulares de ZN y cultivo.

Antes del análisis de las muestras se realizó una estandarización de ambas técnicas. El ensayo de la PCR realizada para el presente estudio fue una modificación de la técnica de PCR hemianidada propuesta por Montenegro *et al.* (N2-PCR) (12, 43, 44), con dos reacciones secuenciales de amplificación y se denominó N2-PCR modificado.

En el N2-PCR modificado todos los reactivos se agregaron en un único tubo, lo cual disminuyó el costo de los reactivos y el riesgo de contaminación, sin que hubiese pérdida significativa de la sensibilidad o especificidad de la reacción (Figuras 1a y 1b). Estas características hacen que la técnica sea adecuada para países en vías de desarrollo como Guatemala. La técnica probó además ser extremadamente funcional para el uso rutinario en un laboratorio clínico, con las ventajas de utilizar un volumen pequeño de muestra (500 ul), y de brindar resultados definitivos con respecto a la presencia o ausencia de *M. tuberculosis* en menos de 24 horas desde la extracción de ADN hasta la detección del amplicon esperado (337 pb).

Antes de la realización del N2-PCR modificado se les realizó a las muestras un control interno de amplificación (β globina humana). La PCR

dirigida al ADN de la β globina humana ha sido utilizada para la evaluación de la cantidad y calidad del ADN celular (45). Este control interno por lo tanto, fue de extrema importancia para garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos pues detectó a las muestras con ADN susceptible a amplificación (principalmente esputos, LCRs y algunos tejidos). El 42.6% de las muestras evaluadas obtuvieron un resultado negativo para la β globina humana, demostrando que no poseían ADN amplificable, probablemente asociado a la escasa cantidad y/o calidad del mismo. Por aparte, el uso de heparina como anticoagulante para las médulas óseas del estudio puede explicar, por lo menos en parte, la baja tasa de positividad de las mismas al control interno (6.4%), pues se ha demostrado el efecto inhibitorio de este anticoagulante al competir con el templado de ADN (46). En estudios posteriores deberán ser tomados en cuenta los factores anteriormente mencionados para optimizar la calidad de los especímenes utilizados en la técnica de PCR así como la evaluación de otras técnicas de extracción de ADN.

Concerniente a la estandarización de la tinción con AO, puede mencionarse que en concordancia con otros estudios, la observación de BAAR utilizando esta técnica requirió tiempo y el desarrollo de destrezas en el uso del microscopio de fluorescencia (17, 18). Con el uso de frotos positivos y negativos para BAAR se logró determinar que los tiempos de tinción más adecuados para la observación de las láminas con la tinción de auramina O fueron de 20'2"2, siendo comparables a los sugeridos por la Sociedad Americana de Microbiología (30).

Con respecto al análisis estadístico de los resultados obtenidos, la PCR fue la técnica que detectó la mayor cantidad de muestras positivas

(38.7%), seguida del cultivo (11.0%) y AO (9.6%). El menor porcentaje de positividad correspondió a la tinción de ZN con únicamente el 2.4% de las muestras (Tabla 3). Es importante recordar que el cultivo de las muestras clínicas fue realizado en dos diferentes medios. Las médulas óseas fueron cultivadas en el medio radiométrico BACTEC®, mientras que el resto de muestras fueron cultivadas en el medio de Löwenstein Jensen (LJ). El medio de LJ no tuvo un rendimiento ideal, al tener una baja tasa de recuperación de *Mycobacterium* sp. comparada con el sistema BACTEC® (7.45 % y 21.2% respectivamente), además de que en 11 muestras (11.7%), el cultivo fue reportado como contaminado, lo cual le restó valor como método de referencia.

Con el fin de una mejor interpretación de los resultados obtenidos se determinaron los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) para cada una de las técnicas (Ziehl Neelsen, auramina O y PCR) con respecto al cultivo, tanto de forma global como por tipo de muestras (Tablas 4-8). Los amplios intervalos de confianza obtenidos son debidos a la escasa cantidad de muestras positivas y a la alta discrepancia encontrada al comparar las técnicas. Con relación a los VPP y VPN, éstos fueron calculados con base a las muestras y no a los pacientes, por tal razón no fueron utilizados para calcular la prevalencia de la TB en la población del presente estudio.

Al analizar el rendimiento global de las técnicas evaluadas con respecto al cultivo (Tabla 4), el N2-PCR modificado demostró poseer una sensibilidad del 100%, una especificidad del 72.5%, un VPP del 17.6%, un VPN del 100.0% y una concordancia (valor *Kappa*) sufrible (0.23). Los valores de sensibilidad y VPN fueron comparables a los obtenidos por el N2-

PCR en muestras pediátricas peruanas (90.4% y 95% respectivamente) pero difirieron grandemente en cuanto a la especificidad, VPP y valor *Kappa* (94.0%, 89% y 0.85 respectivamente) (12). Pueden explicarse estas discrepancias debido a que en el estudio peruano se utilizaron tres medios de cultivo (Tubos indicadores de crecimiento de micobacterias, agar Middlebrook 7H11 y Löwenstein Jensen) lo que permitió la mayor recuperación de micobacterias por cultivo comparado con la utilización exclusiva del medio de LJ (12).

Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente estudio fueron comparables a los obtenidos por Morán y colaboradores (México, 1995-1996), quienes al evaluar un ensayo de PCR en diversas muestras biológicas tuvieron una sensibilidad del 92.3%, una especificidad del 78.7%, un VPP del 20.3% y un VPN del 99.4% (11).

Para explicar la baja concordancia entre el N2-PCR modificado y cultivo se examinaron las historias clínicas de los pacientes que proveyeron muestras con resultado de PCR positivo/cultivo sin aislamiento para *Mycobacterium* sp. (n=21) (Tabla 10). Por esta información fue posible excluir de los análisis estadísticos a 4 muestras (3 esputos y 1 LCR) por estar los pacientes bajo tratamiento antifímico. Estos resultados demostraron que el N2-PCR modificado determinó la presencia de ADN de *M. tuberculosis* en pacientes con tratamiento, aunque los microorganismos no tuvieron la capacidad de crecer en cultivo. La importancia de un resultado de PCR positivo para estos pacientes es discutible, ya que puede ser explicado por la presencia de ADN de micobacterias muertas, no representando un verdadero caso de TB activa, tal como ha sido señalado

por otros autores (47,48). Por otro lado, un resultado de PCR positivo también puede atribuirse a un caso de resistencia farmacológica.

En el resto de casos, por lo menos 5 muestras (3 esputos, 1 LCR y 1 tejido) correspondieron posiblemente a verdaderos positivos para TB los cuales fueron adecuadamente detectados por la PCR y no por el cultivo en LJ, lo que demostró la alta sensibilidad de la primera técnica comparada con la segunda (12,49).

Asimismo, existieron 2 esputos que tuvieron un resultado de PCR positivo y cultivo contaminado de los cuales no es posible aseverar si fueron verdaderos o falsos positivos para TB. Sin embargo, esto exhibió que el rendimiento del cultivo en el medio de Löwenstein Jensen no fue el apropiado, pues no pudo obtenerse por esta técnica un resultado concluyente, lo cual es alarmante considerando la cantidad de tiempo que debe esperarse para obtenerlo. Por ello es recomendable que los laboratorios realicen cultivos por duplicado para incrementar la tasa de detección de *M. tuberculosis*.

Por aparte, a tres de los LCRs evaluados por la PCR se les aisló *C. neoformans* y los mismos también tuvieron un resultado de PCR positivo. Se plantea entonces la posibilidad de que estos pacientes estuviesen cursando con una meningitis debida a una coinfección mixta de *C. neoformans* y *M. tuberculosis* en la cual la presencia del hongo no haya permitido el crecimiento de la micobacteria en el medio de Löwenstein Jensen, mientras que la PCR por su especificidad y mayor sensibilidad sí haya sido capaz de demostrar la presencia de este microorganismo.

Estudios posteriores deberán realizarse para confirmar o descartar la veracidad de esta hipótesis.

Para 8 de las 21 muestras discrepantes entre PCR y cultivo (3 esputos y 5 LCRs) no hay información clínica suficiente que respalde el resultado de PCR positivo. Estos resultados, por lo tanto, pueden atribuirse a que los pacientes de estas muestras tenían ADN de *M. tuberculosis* sin presentar una TB activa, o a problemas de contaminación ocurridos durante la realización de la técnica de PCR (11, 47). Se ha señalado además que la especificidad y VPP de la técnica de PCR puede ser difícil de alcanzar en áreas con hiperendemicidad a TB, además de que el método de referencia, cultivo, puede no tener una adecuada sensibilidad (12). En el caso particular de los LCRs se considera además que es necesario seguir optimizando la técnica, pues no se logró una apropiada reproducibilidad de la misma y las bandas obtenidas no fueron tan claras y visibles comparadas como las observadas en las otras muestras analizadas en este estudio (esputos y tejidos).

A pesar de que es necesario demostrar el rendimiento de la técnica de PCR en un número mayor de muestras con resultados positivos y negativos en cultivo, y una correlación clínica sistematizada, por los resultados obtenidos en este estudio se considera que la técnica de PCR manifestó ser una herramienta de gran potencial para el diagnóstico temprano de TB en pacientes co-infectados con VIH, superior en sensibilidad al medio de Löwenstein Jensen para la recuperación de las micobacterias, al poseer un límite de detección inferior, misma conclusión a la que han llegado otros autores (11).

Estos resultados en conjunto demuestran que es imperativa la reevaluación del cultivo como estándar de oro, especialmente en un solo medio sólido con LJ. En investigaciones posteriores será recomendable incluir un segundo estándar de oro, correspondiente a otra prueba alterna para evaluar a los resultados discrepantes entre cultivo y PCR. Este segundo estándar de oro permitirá resolver los casos en que el cultivo se contaminó o para discernir aquellos casos en que el cultivo se negativizó porque el paciente está bajo tratamiento. El diagnóstico realizado por el médico y el seguimiento clínico del paciente también son factores importantes que permitirán la discriminación de los resultados discrepantes entre PCR y cultivo.

La tinción de auramina O (AO) globalmente presentó una sensibilidad superior a la tinción convencional de Ziehl Neelsen con respecto al cultivo (27.3% y 15.4% respectivamente), lo cual concuerda con otros estudios realizados (16-18). Los mejores resultados de sensibilidad con la tinción de AO fueron obtenidos en muestras de esputos y tejidos, mientras que los peores valores se obtuvieron con médulas óseas, orinas y secreciones.

En el presente trabajo la auramina O presentó una menor especificidad con respecto al cultivo (92.5%) que el ZN (99.0%). En total, 8 muestras de las evaluadas por AO obtuvieron un resultado de AO positivo/cultivo sin aislamiento para *Mycobacterium* sp. Al correlacionar estos resultados discrepantes con los obtenidos por la PCR y con las informaciones clínicas de los pacientes que brindaron estas muestras (Tabla 11), por lo menos 5 (62.5%) de ellas presumiblemente presentaron BAAR. En el caso de dos de estas cinco muestras (una con resultado de PCR positivo

y otra con TB previa) provinieron de pacientes con tratamiento previo o actual de antifímicos; en estos casos pueden existir resultados de auramina O positivo/cultivo negativo sin que signifique fracaso farmacológico ya que las paredes de micobacterias muertas pueden también teñirse con la tinción de AO, por tal razón para la evaluación de estos pacientes es recomendable utilizar la tinción de ZN (25).

Las restantes 3 muestras (2 médulas óseas y 1 esputo) debieron ser consideradas como falsos positivos por AO; debe acotarse que estas muestras se encontraban dentro de la primera mitad del grupo de frotos observados con esta tinción, lo cual sugiere que la falta de experiencia del observador probablemente motivó estos falsos positivos. Para aumentar la especificidad de esta técnica se sugiere en el futuro seguir la recomendación de varios autores que aconsejan que las muestras que sean positivas por AO sean coloreadas con la tinción de ZN y de esta manera puedan confirmarse o descartarse estos resultados (17,30).

En el caso de 5 muestras el resultado de auramina O debió clasificarse como "dudoso", debido a que únicamente se observaron de 1-2 BAAR/frote. Lo recomendable hubiese sido requerir otro espécimen (7). Sin embargo, las condiciones del estudio (retrospectivo) impidieron que dicho procedimiento se efectuara con una nueva muestra por lo que fueron excluidas de los cálculos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la AO con respecto al cultivo. Con el fin de determinar el verdadero diagnóstico de estas muestras se decidió investigar las impresiones clínicas de los pacientes a los que pertenecieron las mismas (Tabla 12). De estas cinco muestras "dudosas" para AO, cuatro de ellas pueden ser verdaderos positivos para TB. Una de ellas (médula ósea), es

definitivamente un verdadero positivo al aislarse del cultivo *Mycobacterium* sp., lo cual es sumamente alentador al tratarse de una muestra extrapulmonar. Otras dos muestras (esputos) fueron cultivo negativo pero PCR positivo. Sin embargo, uno de estos pacientes se encontraba bajo tratamiento antifímico lo que puede explicar el resultado por la capacidad de la AO de teñir las paredes de células micobacterianas muertas sin estar el paciente presentado una TB activa (25); aún así, no puede descartarse que el paciente estuviese cursando con una TB resistente a fármacos. Las restantes dos muestras no tienen un resultado de cultivo porque estos se contaminaron, sin embargo una de estas muestras corresponde a un paciente con alta impresión clínica de TB, al que le dejaron tratamiento el día de la toma de muestra. Por lo tanto, puede inferirse que la observación de apenas 1 ó 2 BAAR en todo el frote con la tinción con AO debe ser tomada con precaución por el laboratorio. La historia clínica del paciente, el tratamiento recibido y el examen de de nuevas muestras facilitarán la interpretación de estos resultados.

Con respecto a la evaluación microscópica de las muestras teñidas con la tinción de AO debe mencionarse que las primeras muestras del estudio evaluadas requirieron tiempos que variaron entre 30 a 60 minutos por frote, debido a que el operador debió capacitarse en el uso del microscopio para alcanzar un adecuado enfoque de las láminas. Además, se encontraron diversos problemas técnicos con la observación con AO, entre ellos puede mencionarse: baja fluorescencia de algunos BAAR, presencia de artefactos y fondos fluorescentes. En algunos casos, estructuras sugestivas de BAAR no pudieron ser confirmadas ni siquiera en el objetivo de 100X.

A pesar de ello, se considera que con una adecuada capacitación y entrenamiento del personal de laboratorio en la observación de láminas por microscopía de fluorescencia y la confirmación de las estructuras dudosas, la tinción de AO puede proveer resultados fiables y rápidos para la detección de BAAR. Cabe mencionar que cuando se alcanzó cierto grado de experiencia, los frotis del estudio pudieron ser observados en aproximadamente 10 minutos, cubriendo amplias porciones de la lámina.

Por su mayor sensibilidad con respecto a la tinción de ZN se considera que la tinción de AO representa una alternativa rutinaria digna de aplicación para el diagnóstico temprano de TB en pacientes co-infectados con VIH/SIDA, demostrando prometedores resultados como alternativa para la observación directa de muestras clínicas en pacientes sin tratamiento antifímico; la tinción de ZN y el cultivo deberán mantenerse como las herramientas diagnósticas rutinarias para el estudio de la respuesta farmacológica. La correlación clínica es fundamental para la adecuada interpretación de los resultados obtenidos por esta técnica.

Finalmente, estos resultados demostraron que las técnicas evaluadas (N2-PCR modificado y tinción auramina O) son herramientas diagnósticas rápidas y más sensibles que la tinción convencional de ZN, facilitando la detección temprana de TB aún en casos de presentaciones extrapulmonares, haciéndolas apropiadas para el diagnóstico de pacientes infectados con VIH. Estudios posteriores deben ser realizados para la optimización de ambos ensayos, lo que hará posible el incremento de sus valores de especificidad. Además, la reevaluación del cultivo como método de referencia es imperativo para la adecuada discriminación de los casos discrepantes. En definitiva, los resultados obtenidos con el uso de

técnicas alternativas y/o convencionales deben estar siempre correlacionados con la información clínica del paciente para el adecuado diagnóstico de TB, el cual sigue siendo hasta la fecha extremadamente complejo.

X. CONCLUSIONES

1. La tinción de auramina O probó ser una herramienta más sensible que la tinción convencional de Ziehl Neelsen para el diagnóstico directo de tuberculosis en esta muestra de pacientes co-infectados con VIH.
2. La técnica de PCR hemianidada *IS6110* utilizada (N2-PCR modificado) demostró ser una técnica sensible, rápida y relativamente simple para el diagnóstico de tuberculosis en esta muestra de pacientes viviendo con VIH/SIDA.
3. El control interno de amplificación (β -globina) al detectar a las muestras con ADN susceptible a amplificación garantizó la confiabilidad de los resultados obtenidos por el N2-PCR modificado.
4. La combinación de N2-PCR modificado y tinción de auramina O mostró ser la combinación que presentó el mejor grado de concordancia entre las técnicas evaluadas.

5. La reevaluación del cultivo en el medio de Löwenstein Jensen como método de referencia es justificada para la confirmación de falsos positivos por PCR y/o auramina O.
6. El diagnóstico de tuberculosis en pacientes infectados con VIH sigue siendo desafiante y el rendimiento del diagnóstico convencional demostró ser subóptimo en esta muestra de pacientes.

RECOMENDACIONES

1. Confirmar la superioridad en sensibilidad de la auramina O con respecto a la tinción de Ziehl Neelsen con un número mayor de muestras clínicas con resultado de cultivo.
2. Mejorar el rendimiento de la tinción de auramina O, a través de la capacitación adecuada del personal de laboratorio en el uso del microscopio de fluorescencia y en el reconocimiento de artefactos fluorescentes con el fin de evitar resultados falsos positivos.
3. Evaluar el uso de otros anticoagulantes diferentes a la heparina para las muestras de médula ósea que sean analizadas por la técnica de N2-PCR modificado.
4. Estandarizar y mejorar los protocolos de recolección de las muestras clínicas que vayan a ser evaluadas con la técnica de N2-PCR modificado.
5. Evaluar nuevos protocolos de extracción de ADN para las muestras clínicas que en el presente estudio no obtuvieron ADN amplificable.
6. Continuar mejorando la sensibilidad y especificidad de la técnica de N2-PCR modificado para cada uno de los diferentes tipos de muestras, utilizando números mayores de muestras clínicas con resultado conocido de cultivo.

7. Evaluar el rendimiento de la técnica de N2-PCR modificado en los tipos de muestras a las que no se les pudo realizar dicho ensayo en el presente estudio (médulas óseas, orinas, huesos).
8. Seguir evaluando la eficiencia de la combinación del N2-PCR modificado y tinción de auramina O en la detección temprana de tuberculosis a través de la determinación de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y coeficiente *Kappa*.
9. Reevaluar el uso del medio de cultivo Löwenstein Jensen como método de referencia para la evaluación del rendimiento de ensayos basados en la PCR. Incluir un segundo estándar de oro consistente en otro método de amplificación de ácidos nucleicos y la correlación de la historia e impresión clínica del paciente.
10. Seguir evaluando nuevas técnicas diagnósticas que puedan representar una alternativa al diagnóstico convencional de tuberculosis en pacientes viviendo con VIH/SIDA.

XI. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Tuberculosis. Fact Sheet No. 104. Revisada Agosto 2002.
2. Drobniowski FA, Pozniak AL, Uttley AH. Tuberculosis and AIDS. *J Med Microbiol.* 1995;43:85-91.
3. Agencia de Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID). *Leading the Way: USAID Responds to HIV/AIDS.* Washington D.C.: The Synergy Project TvT Associates, Inc., Doc. Tec. 1993. 124 p.
4. Velásquez-Porta T, *et al.* Diagnóstico de la infección por micobacterias e identificación de sus factores de riesgo en personas viviendo con HIV/SIDA, a través de un programa de Entrenamiento Docente. Dirección General de Investigación-DIGI-USAC. Asociación de Salud Integral-ASI-. Clínica Familiar "Luis Ángel García".
5. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Tuberculosis; Manual de referencia para la aplicación de las Normas de Atención. Guatemala: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Doc. Tec. 1997. 72 p.
6. Sepkowitz K, *et al.* Tuberculosis in the AIDS Era. *Clin Microbiol Rev.* 1995;5:180-199.
7. Forbes B, Sahm D, Wessfeld A, 11º ed. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.* Estados Unidos: Mosby, Inc, 2002. 1069 p.

8. American Thoracic Society. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases (14th Edition). *Am Rev Respir Dis.* 123:343-358.
9. Caws M, *et al.* Role of IS6110-Targeted PCR, Culture, Biochemical, Clinical, and Immunological Criteria for Diagnosis of Tuberculous Meningitis. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3150-3155.
10. Dalovisio J, *et al.* Comparison of the Amplified Mycobacterium tuberculosis (MTB) Direct Test, Amplicor MTB PCR, and IS6110-PCR for Detection of MTB in Respiratory Specimens. *Clin Infect Dis.* 1996;23:1099-1106.
11. Morán MC, *et al.* Detección de Mycobacterium tuberculosis mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del noroccidente de México. *Rev Panam Salud Pública.* 2000;7:389-393.
12. Montenegro SH, *et al.* Improved Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Peruvian Children by Use of a Heminested IS6110 Polymerase Chain Reaction Assay. *Clin Infect Dis.* 2003;36:16-23.
13. Nagesh BS, *et al.* Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Pleural Fluid. *Chest.* 2001;119:1737-1741.
14. García-Quintanilla A, *et al.* Single –Tube Balanced Heminested PCR for Detection *Mycobacterium tuberculosis* in Smear-Negative Samples. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1166-1169.
15. Bennedsen J, *et al.* Utility of PCR in Diagnosing Pulmonary Tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1996;34:1407-1411.
16. Truant Jp, Brett WA, Thomas WJr. Fluorescence Microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. *Henry Ford Hosp Med Bull.* 1962;10:287-296.

17. Holst E, Mitchison DA, Radhakrishna. Examination of smears for tubercle bacilli by fluorescence microscopy. *Ind J Med Res.* 1959;47:495-499.
18. Ulukanligil M, Aslan G, Tasci S. A Comparative Study on the Different Staining Methods and Number of Specimens for the Detection of Acid Fast Bacilli. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95:855-858.
19. Organización Mundial de la Salud. Informe de Prensa: HIV causing Tuberculosis cases to double in Africa. 23 abril 2001.
20. Organización Mundial de la Salud. WHO Report 2003: Global Tuberculosis Control. 2003.
21. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Semana Epidemiológica. N0.1-2002, comprendida del 30 de diciembre al 5 de enero del 2002. 14 de enero del 2002. Fecha consulta: 10 de diciembre del 2002. Disponible en: <http://www.mspas.gob.gt/epi/2002/01-02.html>.
22. Murray P. *Manual of Clinical Microbiology.* 8° ed. Estados Unidos: ASM Press, 2003. 2322 p.
23. Havlir DV, Barnes P. Current Concepts. Tuberculosis in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection. *N Engl J Med.* 1999;340:367-373.
24. Rom WN, Zhang Y. The rising tide of tuberculosis and the human host response to *Mycobacterium tuberculosis.* *J Lab Clin Med.* 1993;121:737-741.
25. Koneman E, *et al* eds. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* 5° ed. Estados Unidos: Lippincott-Raven Publishers, 1997. XV+1395 p.
26. Wright PW *et al.* Sensitivity of Fluorochrome Microscopy for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* versus Nontuberculous Mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1046-1049.

27. Peterson E, *et al.* Comparison of Direct and Concentrated Acid-Fast Smears to Identify Specimens culture Positive for *Mycobacterium* spp. J Clin Microbiol. 1999;37:3564-3658.
28. Honoré-Bouakline S, *et al.* Rapid Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by PCR: Impac of Sample Preparation and DNA Extraction. J Clin Microbiol. 2003;41:2323-2329.
29. Sheuhar DC, Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. 2° ed. Estados Unidos: The C.V. Mosby Company, 1980. 481 p.
30. Ebersole LL. Acid fast stain procedures in mycobacteriology. (En Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Amer Soc Microbiol. Washington DC, 1995. Sección 3.5).
31. Schluger NW. Changing Approaches to the Diagnosis of Tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 2001;164:2020-2024.
32. Pottumarthy S, Wells VC, Morris AJ. A Comparison of Seven Test for Serological Diagnosis of Tuberculosis. J Clin Microbiol. 2000;38:2227-2231.
33. Perkins M, *et al.* Serologic Diagnosis of Tuberculosis Using a Simple Commercial Multiantigen Assay. Chest. 2003;123:107-112.
34. Pereira LM, *et al.* Development of Antigen Detection Assay for Diagnosis of Tuberculosis Using Sputum Samples. J Clin Microbiol. 2000;38:2278-2283.
35. Julian E, *et al.* Serodiagnosis of Tuberculosis: Comparison of Inmunoglobulin A (IgA) Response to Sulfolipid I with IgG and IgM Responses to 2,3-Diacyltrehalose, 2,3,6-Triacyltrehalose, and Cord Factor Antigens. J Clin Microbiol. 2002;40:3782-3788.
36. Maekura R, *et al.* Clinical Evaluation of Anti-Tuberculous Glycolipid Inmunoglobulin G Antibody Assay for Rapid Serodagnosis of Pulmonary Tuberculosis. J Clin Microbiol. 2001;39:3603-3608.

37. Grobush M, *et al.* Letters to the Editor; Rapid Immunochromatographic Assay for Diagnosis of Tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1998;36:3443-3443.
38. Davis L, Kuehl M, Battey J. *Basic Methods in Molecular Biology.* 2° ed. Estados Unidos: Appleton & Lange, 1994. xiv + 777 p.
39. Thierry D, *et al.* IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:188.
40. Thierry D, *et al.* Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* Insertion Sequence, IS6110, and Its Application in Diagnosis. *J Clin Microbiol.* 1990;28:2668-2673.
41. Eisenach KD, *et al.* Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in esputum simples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144:1160-1163. (Abstracto).
42. Laboratorio de tuberculosis, HGSDD. Manual de Diagnóstico de Micobacterias (traducción libre del ASM Clinical Microbiology Procedures Handbook (1998), con modificaciones y para fines docentes). Guatemala, Doc. Tec. 2000.
43. Caviedes L, *et al.* Rapid, Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum by Microscopic Observation of Broth Cultures. *J Clin : Microbiol.* 2000;38:1203-1208.
44. Montenegro-James S, *et al.* Improved Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by Nested PCR in Paucibacillary Specimens. *Am J Pathol (Annual Meeting Abstracts).* 1998;153:1658.
45. Coutlée F, *et al.* An Important Proportion of Genital Samples Submitted for *Chlamydia trachomatis* Detection by PCR Contain Small Amounts of Cellular DNA Measured by β -Globin Gene Amplification. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2512-2515.
46. Abu Al Soud W, Rådström P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol.* 2001;39:485-493.

47. Wang JY, *et al.* Performance Assesment of a Nested-PCR Assay (the RAPID BAP-MTB) and the BD ProbeTec ET System for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Specimens. J Clin Microbiol. 2004;42:4599-4603.
48. Beige J, *et al.* Clinical Evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR Assay. J Clin Microbiol. 1995;33:90-95.
49. Desai MM, Pal RB. Polymerase Chain Reaction for the Rapid Diagnosis of Tuberculosis Meningitis. Indian J Med Schi. 2002;56:546-552. (Abstracto).
50. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning A Laboratory Manual. Segunda ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vols. 3, Vol.3. Doc Tec., 1989. xxxii + l. 47.
51. Finegold SM, Martin WJ. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 6° ed. Estados Unidos: The C.V. Mosby Company, 1982. xiii + 705 p.
52. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Tuberculosis; Manual de referencia para la aplicación de las Normas de Atención. Guatemala: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Doc. Tec. 1997. 72 p.
53. Organización Panamericana de la Salud. Métodos de Investigación Epidemiológica en Enfermedades Transmisibles. Venezuela, Doc. Tec. 150 p.

XII. ANEXOS

Anexo 1

Protocolo de extracción de ADN de *M. tuberculosis* en esputos¹

A. Decontaminación con el procedimiento estándar de N-acetil-L-cisteína-NaOH².

B. Extracción del ADN.³

1. Colocar 500 µl de muestra en tubos eppendorf.
2. Mezclar bien utilizando vórtex y centrifugar por 4 minutos a 14,000 rpm.
3. Descartar sobrenadante con pipeta y colocar en bolsas rojas de bioseguridad tanto la pipeta como el sobrenadante obtenido.
4. Agregar al precipitado 300 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) conteniendo 1% Triton X-100.
5. Agregar 600 µl de alcohol al 100% (2 volúmenes de alcohol por un volumen de muestra).
6. Mezclar con vórtex y guardar en refrigeración (recomendable 24 horas).
7. Centrifugar la muestra a 14,000 rpm /4 min; si no se observa sedimento repetir centrifugación a 14,000 rpm/7 min.

¹ La extracción de ADN debe realizarse en campana de flujo laminar.

² Laboratorio de tuberculosis, HGSDD. Manual de Diagnóstico de Micobacterias (traducción libre del ASM Clinical Microbiology Procedures Handbook (1998), con modificaciones y para fines docentes). Guatemala, Doc. Tec. 2000.

³ Tomado de: Montenegro SH, et al. Improved Detection of Mycobacterium tuberculosis in Peruvian Children by Use of a Heminested IS6110 Polymerase Chain Reaction Assay. Clin Infect Dis. 2003;36:16-23.

8. Descartar sobrenadante con pipeta.
9. Lavar el precipitado con 600 μ l de buffer TE con Triton X-100 al 1%.
10. Mezclar con vórtex y centrifugar 14,000 rpm /6 min.
11. Descartar sobrenadante y añadir 500 μ l de buffer TE con Triton X-100 al 1%.
12. Mezclar con vórtex, centrifugar 14,000 rpm /3-4 min y descartar sobrenadante por decantación.
13. Agregar pequeño volumen de buffer TE con Triton X-100 1% y Chelex 5% (70 μ l -300 μ l) dependiendo del tamaño del sedimento.⁴
14. Colocar muestras en baño a 95°C/30 min.
15. Centrifugar el lisado a 14,000 rpm/3 min.
16. Guardar el sobrenadante a -70°C (a -20°C en ausencia de congelador a -70°C).

Anexo 2

Protocolo de extracción de ADN de *M. tuberculosis* en orinas y secreciones¹

A. Decontaminación con el procedimiento estándar de N-acetil-L-cisteína-NaOH².

B. Extracción del ADN.³

1. Colocar 500 µl de muestra en tubos eppendorf.
2. Mezclar bien utilizando vórtex y centrifugar por 4 minutos a 14,000 rpm.
3. Descartar sobrenadante con pipeta y colocar en bolsas rojas de bioseguridad tanto la pipeta como el sobrenadante obtenido.
4. Agregar al precipitado 600 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA) conteniendo 1% Triton X-100.
5. Mezclar con vórtex y centrifugar la muestra a 14,000 rpm /6 min.
6. Descartar sobrenadante y añadir 500 µl de buffer TE con Triton X-100 al 1%.
7. Mezclar con vórtex, centrifugar 14,000 rpm /4 min y descartar sobrenadante por decantación.

¹ La extracción de ADN debe realizarse en campana de flujo laminar.

² Laboratorio de tuberculosis, HGSD. Manual de Diagnóstico de Micobacterias (traducción libre del ASM Clinical Microbiology Procedures Handbook (1998), con modificaciones y para fines docentes). Guatemala, Doc. Tec. 2000.

³ Montenegro SH, quien lo modificó de Montenegro SH, et al. Improved Detection of Mycobacterium tuberculosis in Peruvian Children by Use of a Heminested IS6110 Polymerase Chain Reaction Assay. Clin Infect Dis. 2003;36:16-23.

8. Volver a añadir 500 µl de buffer TE con Triton X-100 al 1%.
9. Mezclar con vórtex, centrifugar 14,000 rpm /4 min y descartar sobrenadante por decantación.
10. Agregar pequeño volumen de buffer TE con Triton X-100 1% y Chelex 5% (70µl -250µl) dependiendo del tamaño del sedimento.
11. Colocar muestras en baño a 95°C/30 min.
12. Centrifugar el lisado a 14,000 rpm/3 min.
13. Guardar el sobrenadante a -70°C (a -20°C en ausencia de congelador a -70°C).

Anexo 3

Protocolo de extracción de ADN de *M. tuberculosis* en líquidos cefalorraquídeos¹

A. Extracción del ADN por el método de fenol/cloroformo².

1. Colocar 500 µl (o el volumen con que se cuente) de muestra en tubos eppendorf.
2. Añadir un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) a la muestra. Mezclar bien utilizando vórtex por 10 segundos.
3. Centrifugar a 14,000 rpm /3 min a temperatura ambiente.
4. Transferir la fase acuosa (fase superior) a un nuevo tubo. Descartar el tubo con fenol/cloroformo en recipiente adecuado.
5. Añadir un volumen de 1/10 de acetato de sodio 3M, pH 5.2 a la fase acuosa.
6. Añadir 2.5 µl de glicógeno (20 mg/ml) por cada mililitro inicial de muestra. Mezclar con vórtex.
7. Añadir 2 volúmenes de etanol al 100% frío y mezclar con vórtex.
8. Colocar muestras en congelador a -70°C por dos horas o toda la noche.
9. Centrifugar 14,000 rpm /15 min (centrífuga refrigerada) y descartar sobrenadante.
10. Agregar 300 µl etanol al 70% frío, mezclar con vórtex y centrifugar 14,000 rpm /15 min (centrífuga refrigerada).

¹ La extracción de ADN debe realizarse en campana de flujo laminar.

11. Dejar secar al aire y si es necesario secar paredes del tubo con hisopo de algodón.
12. Añadir 40-50 μ l de buffer TE dependiendo del tamaño del sedimento.
13. Incubar a 65°C durante 1 hora (o a temperatura ambiente toda la noche).
14. Centrifugar a 14,000 rpm/3 min.
15. Guardar a -70°C (a -20°C en ausencia de congelador a -70°C).

Anexo 4

Protocolo de extracción de ADN de *M. tuberculosis* en tejidos¹

A. Extracción del ADN.²

1. Cortar con ayuda de bisturí fragmentos pequeños del tejido.
2. Realizar una suspensión en 300 µl de Solución para Lisis Celular o buffer TE.
3. Transferir a un tubo eppendorf y llevar a un volumen total de 600 µl con Solución para Lisis Celular .
4. Colocar en baño a 65°C y dejar toda la noche.
5. Agregar 200 µl de Solución para Precipitar Proteínas
6. Mezclar vigorosamente con vórtex por 20 segundos.
7. Centrifugar a 14,000 rpm/2 minutos.
8. Transferir el sobrenadante a otro tubo con 600 µl de isopropanol al 100% y mezclar 50 veces por inversión.
9. Agregar 1.5 µl de glicógeno (20 mg/ml).

¹ La extracción de ADN debe realizarse en campana de flujo laminar.

² Protocolo de Puregene™ DNA Isolation Kit (Gentra Systems) y modificaciones por Dr. Montenegro para estas muestras.

10. Congelar las muestras toda la noche.
11. Centrifugar a 14,000 rpm/15 min y descartar el isopropanol con pipeta.
12. Agregar 300 μ l de etanol al 70% y centrifugar 14,000 rpm /5 min.
13. Descartar todo el etanol y dejar secar al aire, si es necesario secar paredes del tubo con hisopo de algodón.
14. Añadir 25-50 μ l de buffer TE dependiendo del tamaño del sedimento.
15. Incubar a 65°C durante 1 hora (o a temperatura ambiente toda la noche).
16. Guardar el sobrenadante a -70°C (a -20°C en ausencia de congelador a -70°C).

Anexo 5

Protocolo No. 1 de extracción de ADN de *M. tuberculosis* en médulas óseas¹

A. Extracción del ADN.²

1. Colocar 500 µl de muestra en tubos eppendorf.
2. Mezclar bien utilizando vórtex y tomar 300 µl de suspensión evitando los coágulos.
3. Pasar a otro tubo con 900 µl de Solución de Lisis para Sangre Roja
4. Mezclar con vórtex.
5. Centrifugar muestras a 14,000 rpm /4 min, a las que se les observe sedimento rojo volver a resuspender este sedimento, mezclar con vórtex y centrifugar a 14,000 rpm/1 min.
6. Separar el sobrenadante con pipeta y centrifugarlo a 14,000 rpm /4 min.
7. Descartar sobrenadante obtenido y añadir 300 µl de Solución de Lisis Celular al sedimento obtenido por la centrifugación.
8. Mezclar con pipeta (no vórtex), incubar a 37°C hasta que ya no se observe precipitado.
9. Enfriar muestras (3 minutos a -10°C) y agregar 100 µl de Solución de Precipitación de Proteínas.
10. Mezclar vigorosamente con vórtex por 20 segundos.
11. Centrifugar a 14,000 rpm/3 minutos.

¹ La extracción de ADN debe realizarse en campana de flujo laminar.

12. Transferir el sobrenadante a otro tubo con 300 µl de isopropanol al 100% y mezclar 50 veces por inversión.
13. Añadir 2.5 µl de glicógeno (20 mg/ml) por cada mililitro inicial de muestra.
14. Congelar las muestras toda la noche.
15. Centrifugar a 14,000 rpm/15 min.
16. Separar el isopropanol con pipeta.
17. Agregar 300 µl de etanol al 70% y centrifugar 14,000 rpm /15 min.
18. Descartar todo el etanol y dejar secar al aire, si es necesario secar paredes del tubo con hisopo de algodón.
19. Añadir 40-50 µl de buffer TE dependiendo del tamaño del sedimento.
20. Incubar a 65°C durante 1 hora (o a temperatura ambiente toda la noche).
21. Guardar el sobrenadante a -70°C (a -20°C en ausencia de congelador a -70°C).

Anexo 6

Protocolo No. 2 de extracción de ADN de *M. tuberculosis* en médulas óseas¹

A. Extracción del ADN.²

1. Colocar 500 µl de muestra en tubos eppendorf.
2. Centrifugar muestras a 14,000 rpm/6min.
3. Descartar sobrenadante con pipeta.
4. Agregar 500 µl de buffer TE.
5. Centrifugar muestras a 14,000 rpm/10 minutos.
6. Descartar el sobrenadante.
7. A las muestras sin sobrenadante límpido volver a agregar 500 µl de buffer TE y centrifugar 12,000 rpm/3 minutos y descartar el sobrenadante.
8. Agregar 600 µl de Solución de Lisis Celular al sedimento obtenido por centrifugación.
9. Con movimientos fuertes y con pipeta deshacer el sedimento; el enfriamiento de las muestras favorece este proceso. Separar los coágulos del sedimento.
10. Agregar 200 µl de Solución para Precipitar Proteínas.
11. Mezclar vigorosamente con vórtex por 20 segundos.
12. Centrifugar a 14,000 rpm/2 minutos.

¹ La extracción de ADN debe realizarse en campana de flujo laminar.

² Protocolo de Puregene™ DNA Isolation Kit (Gentra Systems) y modificaciones por Dr. Montenegro para estas muestras.

13. Transferir el sobrenadante a otro tubo con 600 μ l de isopropanol al 100% y mezclar 50 veces por inversión.
14. Congelar las muestras toda la noche.
15. Centrifugar a 14,000 rpm/15 min.
16. Separar el isopropanol con pipeta.
17. Agregar 300 μ l de etanol al 70% y centrifugar 14,000 rpm /5 min.
18. Descartar todo el etanol y dejar secar al aire, si es necesario secar paredes del tubo con hisopo de algodón.
19. Añadir 25-50 μ l de buffer TE dependiendo del tamaño del sedimento.
20. Incubar a 65°C durante 1 hora (o a temperatura ambiente toda la noche).
21. Guardar el sobrenadante a -70°C (a -20°C en ausencia de congelador a -70°C).

Anexo 7

Técnica de PCR hemianidada IS6110 (N2-PCR modificado)

A. Cuarto blanco: Preparación de la mezcla y los tubos de reacción

1. Calcular la cantidad de mezcla de PCR necesaria para el número deseado de reacciones.
2. Realizar la mezcla maestra tomando en consideración la siguiente tabla:

Ingrediente	(Stock)	{Conc.} Final
ddH ₂ O (agua destilada)		
Buffer 10X	10 X	1 X
MgCl ₂	25 mM	2 mM
Cebador Pt9	1 μM	0.57 μM
Cebador TB290	1 μM	0.55 μM
Cebador Pt8	1 μM	0.20 μM
dNTPs	5 mM	250 μM
(NH ₄) ₂ SO ₄	160 mM	16 mM
Taq Polimerasa con Taq Start	5 U/ul	0.75 U
Rojo cresol	1 μg/ μl en 70% de glicerol	1 μg/10 μl mezcla maestra

Ensayo desarrollado por Dr. Montenegro (2004). Pendiente de publicación. Este protocolo es una modificación de Montenegro SH, *et al.* Improved Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Peruvian Children by Use of a Heminested IS6110 Polymerase Chain Reaction Assay. Clin Infect Dis. 2003;36:16-23.

3. Marcar tubos apropiados para el termociclador disponible.
4. Descongelar las alícuotas de cada reactivo, mezclarlas con vórtex y luego aplicar un golpe de centrifuga para coleccionar el líquido que haya quedado en las paredes del tubo.
5. Preparar la mezcla de PCR con todos los ingredientes excepto la Taq polimerasa. Marcar cada ingrediente sobre la hoja de trabajo luego de haber sido agregado a la mezcla de reacción.
6. Mezclar bien usando un agitador vórtex.
7. Agregar la Taq polimerasa y mezclar bien pipeteando hasta la mitad del volumen total de la mezcla de PCR. Tener cuidado de no crear burbujas.
8. Distribuir 10 μ l de la mezcla de PCR en cada tubo rotulado.
9. Agregar el control negativo del cuarto blanco (3 μ l de ddH₂O).

B. Cuarto gris: Adición de la muestra a la mezcla

1. Agregar 3 μ l de muestra o controles apropiados.
2. Agregar controles en el orden del más negativo al más positivo.
3. Incluir un control negativo de cuarto gris consistente en 3 μ l de ADN humano.
4. Incluir un control positivo consistente en una cepa de *Mycobacterium tuberculosis*.

C. Cuarto negro: Amplificación de la muestra

1. Realizar programa de amplificación de acuerdo al siguiente esquema:

Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
94°C	3 min	1 ciclo
94°C	30 seg	
65°C	35 seg	50 ciclos
72°C	35 seg	
72°C	7 min	1 ciclo
4°C	Hasta el infinito	

Tamaño del producto: Este protocolo amplificará un producto de 337 pb.

Ensayo desarrollado por Dr. Montenegro (2004). Pendiente de publicación. Este protocolo es una modificación de los siguientes trabajos: Caviedes L, *et al.* Rapid, Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum by Microscopic Observation of Broth Cultures. J Clin Microbiol. 2000;38:1203-1208 y Montenegro SH, *et al.* Improved Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Peruvian Children by Use of a Heminested IS6110 Polymerase Chain Reaction Assay. Clin Infect Dis. 2003;36:16-23.

D. Área negra: Análisis del producto

1. Para cada gel, preparar una solución de agarosa al 2.0% en TAE 1X y calentar hasta disolver la agarosa (evitar llevar a ebullición).
2. Dejar enfriar la solución hasta 55°C. Agregar bromuro de etidio (1 mg/ml) aproximadamente 10 μ l por cada 100 ml de buffer. Preparar el gel vertiendo la solución en el molde y moviendo las burbujas hacia las orillas del gel.
3. Preparar buffer de TAE 1X para correr la electroforesis con bromuro de etidio.
4. Preparar un esquema mostrando el orden en que se colocarán las muestras en el gel.
5. Preparar el marcador de ADN: 5 μ l del marcador (escalera de 1000 pb), más 15 μ l de buffer para cargar (colorante), agregar 55 μ l de agua destilada y mezclar bien. Usar 10 μ l del marcador preparado anteriormente para cargar en el gel.
6. Colocar el gel en la cámara de electroforesis y cubrirlo con TAE 1X (0.04 M Tris-acetato, pH 8.0, 0.001 M EDTA)
7. Agregar el volumen total de cada muestra al gel según el orden predeterminado.
8. Correr el gel a \approx 100 V por aproximadamente 20 minutos.
9. Tomar una fotografía usando el sistema de documentación de geles.

ANEXO 8

Preparación de reactivos para la tinción auramina O¹

A. Auramina O

1. Solución 1: Disolver 0.1 gramos de auramina O en 10 ml de etanol al 95%.
2. Solución 2: Disolver 3.0 gramos de cristales de fenol en 87 ml de agua destilada.
3. Combinar soluciones 1 y 2.
4. Colocarle nombre, fecha de preparación y de expiración al reactivo. Guardar en botella oscura a temperatura ambiente.

B. Alcohol-ácido 0.5%

1. Añadir 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado a 100 ml de etanol al 70%.
2. Colocarle nombre, fecha de preparación y de expiración al reactivo. Guardar a temperatura ambiente.

C. Permanganato de potasio

1. Disolver 0.5 gramos de permanganato de potasio en 100 ml de agua destilada.
2. Filtrar solución resultante².

¹ Ebersole LL. Acid fast stain procedures in mycobacteriology. (En Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Amer Soc Microbiol. Washington DC, 1995. Sección 3.5).

3. Colocarle nombre, fecha de preparación y de expiración al reactivo. Guardar en botella oscura a temperatura ambiente.

ANEXO 9

Técnica de tinción con auramina O¹

A. Estandarización de la técnica

1. Realizar tinción de muestras positivas para *Mycobacterium* sp. a diferentes tiempos para encontrar los más prácticos y adecuados que brinden por resultado bacilos alcohol-ácido resistentes fluorescentes, con un fondo de contraste adecuado y con la menor cantidad de artefactos.

B. Preparación de láminas

1. Preparar frotos de las muestras clínicas no concentradas, transferir con un palillo de madera una porción del material que se encuentre más necrótico o purulento a una lámina porta objetos de vidrio limpia.
2. Seguidamente realizar el frote y dejar secar al aire.
3. Fijar el frote con ayuda de un mechero, pasándolo de tres a cuatro veces sobre la llama.

C. Control de calidad

¹ Ebersole LL. Acid fast stain procedures in mycobacteriology. (En Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Amer Soc Microbiol. Washington DC, 1995. Sección 3.5).

1. Incluir láminas con control positivo y control negativo (suspensiones de *Mycobacterium* sp. y *Escherichia coli* respectivamente) para cada serie de frotis a teñir.

D. Procedimiento de tinción

1. Agregar auramina O sobre el frote frío.
2. Seguidamente lavar con agua.
3. Agregar alcohol-ácido al 0.5%.
4. Volver a lavar.
5. Agregar el permanganato de potasio 0.5%.
6. Lavar finalmente con agua.
7. Los tiempos necesarios de exposición de los frotis a cada uno de los reactivos serán aquellos que resulten de la estandarización previamente realizada (numeral A).

E. Observación microscópica

1. Permitir que el frote seque al aire y examinarlo en un microscopio de fluorescencia con el objetivo de 40X.
2. Confirmar morfología con el objetivo de 100X.
3. Examinar como mínimo 100 campos y reportar de acuerdo a la siguiente tabla:

Número de BAAR vistos con tinción de fluorocromos (Magnificación de 450X)	Reporte
0	No se observaron BAAR
1-2BAAR/ 70 campos	Dudoso, se requiere otro

	espécimen
2-18 BAAR/50 campos	1+
4-36 BAAR/10 campos	2+
4-36 BAAR/campo	3+
Más de 36 BAAR/campo	4+

Tomado de: Forbes B, Sahm D, Wessfeld A, 11° ed. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Estados Unidos: Mosby, Inc, 2002. 1069 p., siendo una modificación de Kent PT y Kubica GP: Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Servicio de Salud Pública, CDC, Atlanta, 1985.

ANEXO 10

Reporte de BAAR de acuerdo a la Comisión Nacional de tuberculosis.

0-1 BAAR promedio por campo, leyendo 100 campos (total 1-100 bacilos)	+
1-10 BAAR promedio por campo, leyendo 50 campos	++
10 o más BAAR promedio por campo, leyendo 20 campos	+++
No se encuentran BAAR en 100 campos	Neg

Tomado de: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Tuberculosis; Manual de referencia para la aplicación de las Normas de Atención. Guatemala: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Doc. Tec. 1997. 72 p.

ANEXO 11

Análisis de resultados I: Fórmulas para cálculo de indicadores para evaluación de prueba diagnóstica

		Método de referencia	
		Positivo	Negativo
Prueba	Positiva	Verdadero Positivo (a)	Falso Positivo (b)
	Negativa	Falso Negativo (c)	Verdadero Negativo (d)

$$N = (a + b + c + d)$$

Indicadores evaluación de la validez de
una prueba de diagnóstico

Sensibilidad

$$a/(a + c)$$

Especificidad	$d/(b+d)$
Valor predictivo positivo	$a/(a+b)$
Valor predictivo negativo	$d/(c+d)$
Clasificación correcta (exactitud)	$a+d/N$
Clasificación incorrecta	$b+c/N$

Tomado de: Organización Panamericana de la Salud. Métodos de Investigación Epidemiológica en Enfermedades Transmisibles. Venezuela,

ANEXO 12

Análisis de resultados II: Cálculo de índice *Kappa* (k) e Interpretación

$$k = \frac{2(AD + BC)}{N_1 N_4 + N_2 N_3}$$

donde las N son los totales marginales etiquetados así:

		Método # 1		
		Sí	No	
Método #2	Sí	A	B	N_1
	No	C	D	N_2
		N_3	N_4	Total

<i>Kappa</i>	Concordancia
< 0.00	Mala
0.00-0.20	Pobre
0.21-0.40	Sufrible
0.41-0.60	Regular
0.61-0.80	Buena
0.81-0.99	Óptima
1.00	Perfecta

Tomado de: Organización Panamericana de la Salud. Métodos de Investigación Epidemiológica en Enfermedades Transmisibles. Venezuela,

ANEXO 13. Información Clínica de pacientes que presentaron un resultado de PCR positivo/ZN y cultivo negativo¹ en esputos.

Impresión Clínica					
No.	10-45 días antes de toma de muestra	Día de toma de muestra	10-45 días después de toma de muestra	Tenía tratamiento ARV ² /antifímico día de la toma de muestra	Comentarios
1	Asintomático	Asintomático, TB pulmonar vrs. MAC-reactivación, fracaso farmacológico.	Meningitis Cripto, Toxoplasmosis, TB meníngea, TB pulmonar plan B	Antifímicos, ARVs.	Examen para esputo 1 de aprox. dos meses antes de esta toma de muestra también incluido en este estudio: ZN, AO: Neg., PCR inconcluso, cultivo: negativo. Se aisló <i>Mycobacterium</i> sp. del esputo 3 realizado en dicha época. Prueba de niacina fue positiva: <i>M. tuberculosis</i> . Antibiograma reveló que cepa resistente a isoniazida, rifampicina, estreptomocina y etambutol.
2	TB pulmonar	Sinusitis	TB pulmonar, Candidiasis oral	Antifímicos, ARVs.	Resultado dudoso para auramina O. Inició tratamiento antifímico tres meses antes de toma de muestra por ZN esputo positivos.. Examen para esputo 1 de aprox. 20 días antes de esta toma de muestra también incluido en este estudio: ZN, AO, PCR, cultivo: negativo. Examen para LCR de aprox. 45 días después de esta toma de muestra también incluido en este estudio: PCR, cultivo: negativo.
3	Adenopatía cervical posterior	TB ganglionar en 3 semana de tratamiento antifímico, tos y fiebre a) PCP, b) bacteriano	TB ganglionar	Antifímicos	Resultado positivo también para auramina O. Este paciente también presentó un resultado PCR y auramina O positivo/ZN y cultivo negativo de biopsia de ganglio cervical realizado un mes antes de esta toma de muestra. Por resultado de patología de biopsia de ganglio se inició tratamiento antifímico.
4	VIH/SIDA, Candidiasis oral, SDC, Sme. de desgaste (5 días antes)	Adenopatía cervical posterior izquierda a) micobacterias, b) VIH, c) Hongos. Infección pulmonar a) TB, b) PCP, c) Hongos	Infección fúngica diseminada		Resultado positivo también para auramina O. Por impresión clínica el día de la toma de muestra se le dejó al paciente antifímicos e itroconazol (TB e histoplasmosis respectivamente). También se le realizaron en la misma fecha, exámenes de MO y biopsia de hueso (incluidos en este estudio). Los resultados fueron MO: ZN, AO, cultivo: Neg.. Biopsia de hueso: ZN neg, AO dudoso, cultivo contaminado. Después patología reportó de médula ósea estructuras levaduriformes PAS positivas sugestivas de infección micótica. Siguió con tratamiento antifímico e itroconazol.
5	Otitis ½ oído izquierdo, Candida oral, inf. fúngica diseminada	Tuberculosis Por hallazgos radiológicos y clínico se inician empíricamente antifímicos.	Micosis diseminada en supresión y TB diseminada por diagnóstico. SIDA y herpes oral (5 meses después)		Paciente sólo cumplió dos meses el tratamiento antifímico. Patología reportó de médula ósea estructuras levaduriformes PAS positivas sugestivas de infección micótica. Once meses después de toma de muestra vuelve a presentar problemas respiratorios (tos) y de muestra de esputo se aisló posteriormente <i>Mycobacterium</i> sp.

¹En el caso de los pacientes No. 10 y 11 no existe resultado final de cultivo por contaminación. ² ARVS = antiretrovirales,

Cont. ANEXO 13. Información Clínica de pacientes que presentaron un resultado de PCR positivo/ZN y cultivo negativo¹ en esputos.

Impresión Clínica					
No.	10-45 días antes de toma de muestra	Día de toma de muestra	10-45 días después de toma de muestra	Tenía tratamiento ARV/antifímico día de la toma de muestra	Comentarios
6	TB pulmonar en el último año y extrapulmonar en curso (dos meses antes)	Bronquitis	Asintomático	ARVs. Terminó tratamiento antifímico 18 días antes de toma de muestra	17 meses antes de toma de muestra el paciente diagnosticado con TB. Tuvo tratamiento de segunda línea. 8 meses antes de toma de muestra, exámenes de muestras de esputo y secreción de ganglio fueron negativas para TB.
7	ND ³	Fiebre no cuantificada por termómetro, D/C TB pulmonar	Laringitis crónica		Resultado dudoso para auramina O. De esputo se aisló <i>Streptococcus</i> β hemolítico del grupo "A". 8 meses después de toma de muestra paciente se presentó como emergencia, se sospechó de infección diseminada, paciente falleció dos días después. Exámenes microbiológicos que se realizaron no ayudaron a determinar diagnóstico (baciloscopia esputo negativa).
8	Fiebre en estudio SDC en estudio Síndrome de desgaste	SDA @, D/C Infección oportunista	IRS, Síndrome de desgaste, SDC, anemia		Paciente a quién también se le solicitaron en la misma fecha, exámenes para médula ósea y biopsia de hueso (incluidos en este estudio): ZN, AO, cultivo: negativo. Paciente ingresó 10 meses después de toma de muestra a HGSJDD, con impresión clínica de SIDA, reactivación de citomegalovirus, hemiparesia y retinitis secundarias al mismo, paciente falleció 15 días después.
9	ND	D/C Infección oportunista a) TB diseminada, ganglionar b) hongos	Cefalea		Creció <i>C. albicans</i> en esputo Paciente a quién también se le solicitaron exámenes para médula ósea, biopsia de hueso y orina (incluidos en este estudio): ZN, AO, cultivo: Neg. 14 días después de toma de muestra, por cefalea se solicita examen de LCR: PCR y cultivo neg.
10	Infección recurrente de tracto respiratorio superior Sinusitis	Anemia, SX. De desgaste	Resfriado común, infección recurrente de tracto	Ese día le dejaron ARVs.	No hay resultado final para el cultivo porque éste se contaminó. Tres meses antes de toma de muestra se sospechó por tos y fiebre de TB pulmonar o micosis diseminada y por lesión ocular de TB ocular. Se aisló <i>Streptococcus</i> sp. de dos esputos. Dos meses después de toma de muestra paciente con granuloma en

			respiratorio superior		ojo derecho y con impresión clínica de BNM leve.
11	Candidiasis oral, herpes oral, HIV/SIDA	Linfoma? Mialgias secundarias a VIH	Mialgia y artralgia, SIDA. (dos meses después)	ARVs.	Creció <i>Candida</i> sp. en el esputo. Paciente con resultados para este estudio de un segundo esputo examinado 7 días después de esta toma de muestra: ZN, AO, PCR: neg. No hay resultado final para ninguno de los dos cultivo de esputo porque ambos se contaminaron.

³No hay datos.

ANEXO 14. Información Clínica de pacientes que presentaron un resultado de PCR positivo/cultivo negativo¹ en LCRs.

No.	Impresión Clínica			Examen Químico del LCR			
	10-45 días antes de toma de muestra	Día de toma de muestra	10-45 días después de toma de muestra	Tenía tratamiento ARV ² /antifímico día de la toma de muestra	Proteínas (mg/dl) Valor normal: (15-45 mg/dl)	Glucosa (mg/dl) Valor normal: (40-70 mg/dl)	Comentarios
1	TB diseminada. Debe continuar tratamiento antifímico.	TB meníngea. Se le insiste en uso de antifímicos.	ND	ARVs. Mala adherencia a antifímicos ³	136	22.9	Paciente previamente diagnosticado por impresión clínica con TB diseminada.
2	Fiebre estudio: TB, hongos	Meningitis por <i>Cryptococcus</i> sp. TB diseminada.	Meningitis por <i>Cryptococcus</i> sp. → (s) TB diseminada en tratamiento	Antifímicos.	126	39.1	Se aisló <i>C. neoformans</i> del LCR. Dos meses antes de esta toma de muestra se le realizaron exámenes de orina y MO (incluidos en este estudio): Orina: ZN, AO: Neg., PCR inconcluso, cultivo: <i>Mycobacterium</i> sp. MO: ZN, AO, cultivo: Neg.
3	Síndrome depresivo por duelo, HIV asintomático	Meningitis por <i>Cryptococcus</i> sp.	VIH, cefalea		60	40.7	
4	Asintomático (2 meses antes)	Cefalea de et? Anemia? Sinusitis	Asintomático	ARVs.	64	46	Hematocrito = 9%. Origen de cefalea se cree que es por anemia debida a intolerancia a un ARV, se cambia el mismo y paciente refiere mejoría.
5	VIH asintomático (2 meses antes)	Cefalea a estudio a) <i>Cryptococcus</i> sp.	Cefalea en @		67	51.5	
6	Cefalea de et a) VIH, b) Oportunistas- <i>Toxoplasma</i> , <i>Histoplasma</i>	Cefalea de et a <i>Toxoplasma</i> , criptococosis, otro oportunista	Asintomático, sinusitis		ND	ND	
7	ND	Meningitis por <i>Cryptococcus</i> sp.	ND		38	17.6	Se aisló <i>C. neoformans</i> del LCR. No hay resultado final para el cultivo en el medio de Löwenstein Jensen por que en el mismo creció <i>C. neoformans</i> .
8	ND	Inf. SNC a) <i>Cryptococcus</i> sp.	Meningitis por <i>Cryptococcus</i> sp.		83	37	Se aisló <i>C. neoformans</i> del LCR.

9	Asintomático Cefalea de et?	Meningitis a descartar	Criptococosis extrapulmonar (4 días después de toma muestra)	145	64	No se aisló <i>C. neoformans</i> del LCR pero por sospecha clínica se inicia Anfotericina B.
---	--------------------------------	------------------------	---	-----	----	--

¹En el caso de los pacientes No. 7 no existe resultado final de cultivo. ²ARVS = antiretrovirales, ³Paciente el día de la toma de muestra indicó que no está cumpliendo su tratamiento de antifímicos.

ANEXO 15. Información Clínica de pacientes que presentaron un resultado de auramina O positivo/ZN y cultivo negativo¹.

No.	Tipo de muestra	10-45 días antes de toma de muestra	Día de toma de muestra	10-45 días después de toma de muestra	Tenía tratamiento ARV ² /antifímico día de la toma de muestra	Comentario
1	Biopsia Cervica I ganglio Esputo	ND Adenopatía cervical posterior	Adenopatía cervical posterior TB ganglionar en 3 semana de tratamiento antifímico, tos y fiebre a) PCP, b) bacteriano	TB ganglionar en 3 semana de tratamiento, tos y fiebre a) PCP, b) Bacteriano TB ganglionar	Antifímicos	Paciente quien tiene dos muestras en este estudio: a) biopsia de ganglio y un mes después b) esputo. Para ambas muestras: AO y PCR positivo/ZN y cultivo negativo. Resultado de patología de ganglio evidenció necrosis caseosa, granuloma y células gigantes tipo Langhans. Por este resultado se inició antifímicos. Este paciente corresponde paciente No.3 de tabla 13.
2	Esputo 1	VIH/SIDA, Candidiasis oral, SDC, Sme. de desgaste (5 días antes)	Adenopatía cervical posterior izquierda a) micobacterias, b) VIH, c) Hongos. Infección pulmonar a) TB, b) PCP, c) Hongos	Infección fúngica diseminada		PCR positivo. Por impresión clínica el día de la toma de muestra se le dejó al paciente antifímicos e itroconazol (TB e histoplasmosis respectivamente). También se le realizaron en la misma fecha, exámenes de MO y biopsia de hueso (incluidos en este estudio). Los resultados fueron MO: ZN, AO, cultivo: Neg.. Biopsia de hueso: ZN neg, AO dudoso, cultivo contaminado. Después patología reportó de médula ósea estructuras levaduriformes PAS positivas sugestivas de infección micótica. Siguió con tratamiento antifímico e itroconazol. Este paciente corresponde paciente No.4 de tabla 13.
3	Biopsia hueso	Fiebre de origen no determinado Síndrome de desgaste	Fiebre de origen a determinar a) <i>Histoplasma</i> , b) TB diseminada. 3) Hepatoesplenomegalia secundaria a fiebre?	Paciente falleció 8 días después de toma muestra		No hay resultado final para el cultivo porque éste se contaminó. Resultado del cultivo de médula ósea (incluido en este estudio) fue: ZN: neg, AO: inconcluso (frote muy grueso), Cultivo: Positivo.
4	Orina 1	Papilomatosis genital, candidiasis vaginal	ITU a) bacteriana, b) TB renal Masa abdominal de etiología	(50 días) Asintomático, hepatoesplenomegalia VIH	ARVs	Dos meses antes de toma de muestra paciente estaba todavía en tratamiento antifímico presuntamente por TB extrapulmonar (TB intestinal sin datos de laboratorio que lo confirmen). 06 meses después de toma de muestra paciente de nuevo hospitalizado por fiebre y adenopatía abdominal. Cultivos para TB de orina (3) fue negativo.
5	MO	VIH asintomático	SDC → @, VIH +, No hay impresión clínica. Paciente refiere fiebre no cuantificada por termómetro	Hemorragia?(HGII)		Cocos gram positivo y bacilos gram negativo escasos en médula ósea.
6	MO	ND	SDC @ , SX de desgaste, se sugiere MO por picos febriles	Linfoma de células grandes de alto grado de malignidad		Por resultado de patología se diagnosticó linfoma. Paciente falleció pocos días después de toma de muestra. <i>Acinetobacter woffii</i> se aisló de médula ósea. Resultado del cultivo de biopsia de hueso (incluido en este estudio)

				fue: ZN, AO, cultivo negativo.
7	Espuito 1	Herpes simple mucocutaneo genital	FNCXT + tos de et? a) TB pulmonar, b) histoplasmosis, c) Otros ND	PCR: Negativo. Paciente falleció dos meses después de toma de muestra.

¹En el caso de los pacientes No. 3 no existe resultado final de cultivo por contaminación. ² ARVS = antiretrovirales,

ANEXO 16. Información Clínica de pacientes que presentaron un resultado de auramina O dudoso.

No.	Tipo de muestra	10-45 días antes de toma de muestra	Día de toma de muestra	10-45 días después de toma de muestra	Tenía tratamiento ARV ¹ /antifímico día de la toma de muestra	Comentario
1	MO	Fiebre constante o intermitente por mas de 1 mes: Micosis entre otros DX	Micosis o TB diseminada	TB extrapulmonar en tratamiento	El día de toma de muestra le dejaron ARVs.	ZN: Neg. Cultivo positivo, se aisló <i>Mycobacterium</i> sp. Prueba de niacina negativo.
2	Espuito	TB pulmonar	Sinusitis	TB pulmonar, Candidiasis oral	Antifímicos, ARVs	PCR positivo ZN y cultivo negativo. Inició tratamiento antifímico tres meses antes de toma de muestra por ZN esputo positivos. Examen para esputo 1 de aprox. 20 días antes de esta toma de muestra también incluido en este estudio: ZN, AO, PCR, cultivo: negativo. Examen para LCR de aprox. 45 días después de esta toma de muestra también incluido en este estudio: PCR, cultivo: negativo.
3	Biopsia hueso	VIH/SIDA, Candidiasis oral, SDC, Sme. de desgaste (5 días antes)	Adenopatía cervical posterior izquierda a) micobacterias, b) VIH, c) Hongos. Infección pulmonar a) TB, b) PCP, c) Hongos	Infección fúngica diseminada		ZN: Neg. No hay resultado final para el cultivo porque éste se contaminó. Paciente con muestra de esputo y médula ósea para este estudio. Espuito: PCR, AO pos, ZN y cultivo neg. MO: ZN, AO y cultivo negativo. Por impresión clínica el día de la toma de muestra se le dejo al paciente antifímicos e itroconazol (TB e histoplasmosis respectivamente). Después patología reportó de médula ósea estructuras levaduriformes PAS positivas sugestivas de infección micótica. Siguió con tratamiento antifímico e itroconazol.
4	Espuito 1	ND ²	Fiebre no cuantificada por termómetro, D/C TB pulmonar	Laringitis crónica		PCR positivo, ZN y cultivo negativo. De esputo se aisló <i>Streptococcus</i> β hemolítico del grupo "A".
5	Espuito	Sinusitis	Sarcoma de	Tos no productiva	ARVs.	08 meses después de toma de muestra paciente se presentó como emergencia, se sospechó de infección diseminada, paciente falleció dos días después. Exámenes microbiológicos que se realizaron no ayudaron a determinar diagnóstico (baciloscopía esputo negativa). ZN: Neg. No hay resultado final para el cultivo porque éste se

Kaposi	nocturna. No hay impresión clínica. Meses después paciente refiere sentirse mejor.	contaminó. Resultado de PCR fue inconcluso.
--------	--	---

¹ ARVs= antiretrovirales