

LA BACILOSCOPIA Y EL CULTIVO EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR

Jorge Martín Llaca Díaz, Amador Flores Aréchiga, María Gloria Martínez Guerra y Pedro César Cantú Martínez*

Departamento de Patología Clínica, Hospital Universitario "Dr. José E. González", Universidad Autónoma de Nuevo León (México)

*Facultad de Salud Pública y Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León (México)

E-mail: jorgellaca@hotmail.com

Introducción



La tuberculosis es una enfermedad que continúa siendo un problema serio de salud pública para el mundo y que causa millones de casos nuevos cada año, a pesar de que se puede prevenir y curar.

Se estima que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectado por *Mycobacterium tuberculosis*. Aproximadamente unos nueve millones de nuevos casos de Tuberculosis y cerca de tres millones de personas murieron de la enfermedad en 1995. El *Mycobacterium tuberculosis* causa más defunciones que cualquier otra enfermedad infecciosa considerada en forma aislada.

Es una enfermedad que afecta a grupos de edad económicamente activos (15-50 años) principalmente en los países en desarrollo, las defunciones por TB representan el 25% del total de muertes evitables. Se han identificado factores que influyen en la morbilidad por Tuberculosis en el mundo como son; la pobreza, negligencia en el diagnóstico así como en el tratamiento y la pandemia de VIH/SIDA.(1)

A finales del año 2000, 36 millones de personas en el mundo vivían con VIH/SIDA, el doble de la cifra que predecía la OMS en 1991. En 1999, aproximadamente tres cuartos de las personas afectadas por el VIH/SIDA vivían en los 22 países con alta incidencia de tuberculosis del mundo. Tan sólo en el año 2000, más de cinco millones de personas fueron infectadas por el VIH. Los países con mayores tasas de VIH también poseen las mayores tasas de tuberculosis por cada 100 000 habitantes.(2)

No obstante el predominio de la tuberculosis pulmonar sobre la tuberculosis extrapulmonar, la incidencia de esta última está aumentando en países como Estados Unidos y Canadá, sobre todo en grupos de riesgo como los HIV seropositivos. A partir de la primoinfección tuberculosa (sitio inicial de infección) en el pulmón que ocurre generalmente durante la infancia sobre todo en países con una alta prevalencia de la enfermedad, la diseminación a partir de este sitio es linfohemática llegando principalmente a sitios como ganglios linfáticos, pulmones, riñones, médula ósea, meninges y otros.(3)

La baciloscopia, es la técnica fundamental en toda investigación bacteriológica de la tuberculosis, en la detección de casos y control de tratamiento. Con un costo bajo y de rápida ejecución, la baciloscopia es una técnica que permite identificar al 70-80% de los casos pulmonares positivos.(4)

El diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar depende de la probabilidad de encontrar los bacilos en los sitios de infección, los cuales se encuentran en cantidades muy pequeñas, excepto si hay caesificación o formación de cavidades, las biopsias del tejido pueden rendir resultados positivos en comparación a los fluidos en donde el número de los bacilos se ve disminuido por la dilución. El diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar es difícil a menudo por su localización en sitios del organismo de acceso complicado, además el carácter serio de esta forma de tuberculosis se debe frecuentemente a su diagnóstico tardío.

El presente estudio pretende evaluar la sensibilidad y especificidad de la baciloscopia que se realiza en especímenes provenientes de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis pulmonar, para determinar su capacidad para diagnosticar la tuberculosis extrapulmonar en forma correcta.

Material y Métodos

Los especímenes de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar, fueron estudiados en el intervalo comprendido entre los meses de enero de 2000 a diciembre del 2001, en el Departamento de Patología Clínica, del Hospital Universitario "Dr. José E. González", de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Nuevo León, México)

El área de trabajo para baciloscopias fue un Gabinete de Seguridad Biológica Tipo II, BBL / Becton Dickinson. Se trabajaron un máximo de 12 muestras en cada tanda, una vez hecha la hoja de trabajo debidamente registradas las muestras se identifican con el número de laboratorio que le correspondió y se colocan en la mesa de trabajo en el orden correspondiente.

Con lápiz diamante se numera en uno de los extremos los portaobjetos nuevos de medida estándar (7.5 cm por 2.5 cm). Un Químico fue el encargado de realizar los frotis de todas las muestras, se ejecutaron frotis de área reducida (dos centímetros cuadrados).

Con el mechero encendido se procedió a destapar la muestra que se coloca junto al portaobjetos que le corresponde. Una vez seleccionada la parte de la muestra, que en el caso de los diversos líquidos obtenidos por punción es el sedimento obtenido por centrifugación por 15 minutos a 3 000 RPM, si se trata de biopsias, estas se maceran en mortero estéril con unos pocos mililitros de agua destilada y de aquí se toma para el frotis y el resto para el cultivo.

Se coloca la muestra en el portaobjetos con la ayuda de pipetas Pasteur estériles y se procede a extenderla con aplicadores de madera, con movimientos circulares y finalmente de vaivén hasta formar una película lo más uniforme posible, se flamea el portaobjetos por los bordes únicamente par evitar que se derrame la muestra y se coloca en una charola donde se dejará secar a temperatura ambiente.

Los aplicadores de madera se desechan en un frasco de vidrio de un litro de capacidad aproximadamente el cual contendrá unos 100 mililitros de fenol al 5%. Una vez terminado el trabajo se desinfectó el área con algodón embebido de fenol al 5% el cual también se desechó en el frasco de vidrio para esterilizarse en autoclave. Es recomendable la protección con bata de maga larga, guantes y mascarilla (4,5).

La técnica de tinción utilizada fue la de Ziehl-Neelsen tradicional. Cuando se examina muestras de esputo u otras lesiones en donde estas bacterias se encuentran, al microscopio, previa coloración de los extendidos, su característica principal es su ácido-alcohol resistencia (AAR) ya que son difíciles de teñir con fucsina pero una vez teñidos resisten a la decoloración con alcohol-ácido.

La tinción de Ziehl-Neelsen se hace de la siguiente forma; se fija la baciloscopia con calor, se colocan los frotis sobre varillas y separados por un centímetro, se cubren con fucsina previamente filtrada. Se calientan los frotis flameándolas con una varilla provista en un extremo con torunda embebida en alcohol, hasta que empiece la emisión de vapores se deja de calentar y repite la operación dos veces más. Se elimina el colorante con agua corriente y chorro suave. Se agrega alcohol-ácido por 2 minutos. Se enjuaga con agua corriente y se aplica el colorante de contraste que es el azul de metileno por espacio de 5 minutos. Se enjuaga con agua corriente y se deja escurrir en forma vertical sobre papel absorbente hasta que se seque. (6)

La observación microscópica la realizó un Químico, experto con 17 años en observación de baciloscopias. Empleó microscopio binocular marca Zeiss modelo K7, con oculares de 20X y objetivo de inmersión 100X.

La observación debe establecer en primer término si se encuentran BAAR en el extendido y si los hay, el número aproximado de ellos por campo microscópico.

Cada campo microscópico debe observarse en superficie y profundidad, para esto se utilizó constantemente el tornillo micrométrico. Los bacilos aparecen como bastoncillos delgados de color rojo y con gránulos en su interior, aislados, en pares o agrupados sobre un fondo azul claro de la tinción de contraste. La contabilidad debe seguir una pauta uniforme de observación leyendo de izquierda a derecha del extendido un mínimo de 100 campos útiles distribuidos en el total del extendido.

El criterio a seguir en la baciloscopia es: el número de campos varía según la cantidad de bacilos encontrados:

1. Si no se encuentran bacilos debe examinarse por lo menos 100 campos útiles.
2. Si se encuentran de 1 a 10 bacilos por campo es suficiente observar 50 campos.
3. Si se encuentran más de 10 bacilos por campo es suficiente observar 20 campos.

Terminada la observación de la baciloscopia es requisito que se limpie con algodón el objetivo de inmersión para evitar que se transporten fragmentos de una baciloscopia a otra.

INFORME DE RESULTADOS.

Negativo: no se observan BAAR en 100 campos observados.

Positivo +: se observan menos de un bacilo por campo en promedio en 100 campos observados.

Positivo ++: se observan de 1 a 10 bacilos por campo en promedio en 50 campos observados.

Positivo +++: Se observan más de 10 bacilos por campo en promedio en 20 campos observados.

Es necesario encontrar como mínimo 4 BAAR en la Bac para reportarlo positiva, si se encuentran de 1 a 3 bacilos esta es la conducta a seguir:

1. Ampliar la lectura a 200 campos.

2. Si lo anterior no modifica la lectura repetir la Bac.
3. Si se encuentra la misma cantidad de bacilos (1 a 3) se reporta como negativo poniendo una nota en el diario de trabajo sobre lo observado.

Para el cultivo del bacilo tuberculoso se utilizó un medio de cultivo líquido de Middlebrook selectivo gracias al agregado de un suplemento con cinco antibióticos, destinado para su uso con un sistema de detección automatizada MB/Bact, el cual llega a tener una sensibilidad y especificidad del 100% en comparación con otros métodos de cultivo tradicional. (7)

Previamente se descontaminan las muestras por el método de Petroff, se colocan las muestras por orden y se numeran en el mismo orden tubos estériles conteniendo cada uno de ellos 4 mililitros de hidróxido de sodio al 4% con rojo fenol, se destapa la primer muestra y con pipeta Pasteur se toman aproximadamente 4 mililitros y se transportan al tubo donde se depositará, la pipeta se desecha en un frasco igual al utilizado en la preparación de la Baciloscopia.

El tubo se lleva al agitador tipo vortex y se agita por 20 segundos, se incuba por 15 minutos a 37°C y posteriormente centrifugar por 15 minutos a 3000 RPM., los pasos anteriores deben ser considerados sumamente peligrosos por lo que deben llevarse a cabo con cuidado para evitar la formación aerosoles(8)

Se elimina el sobrenadante en el frasco de desecho y los sedimentos de cada tubo se neutralizan con ácido clorhídrico 1N, las botellas de MB/Bact, se inoculan con 0.5 ml del líquido concentrado.

El sistema de detección MB/Bact utiliza un sensor colorimétrico y refleja la luz para detectar la presencia y producción de CO₂ disuelto en el medio de cultivo. Si la muestra contiene microorganismos, se produce CO₂ como producto del metabolismo bacteriano.

Los cultivos positivos detectados por el sistema MB/Bact, fueron identificados mediante pruebas como: niacina, catalasa a 25 y 68°C, ureasa, hidrólisis del Tween 80, reducción de nitratos a nitritos, características macroscópicas de las colonias en medio de Lowenstein-Jensen y frotis de la colonia para observar sus características microscópicas. (9)

Resultados

Los pacientes estudiados fueron 1937, de los cuales 1239 aportaron muestras de esputo y 698 muestras no pulmonares.

De los 698 pacientes con muestras no pulmonares, 201 (28.7%) fueron de líquido pleural, 193 (27.6%) de líquido cefalorraquídeo, 80 (11.4%) de orina y 224 (32.0%) de otros tipos de especímenes. La baciloscopia resultó positiva en el 4.9% de los casos de otros especímenes, mientras que fue de 0% en el líquido cefalorraquídeo, del 1.2% en orina y de 0.9% en los líquidos pleurales. El cultivo fue positivo en el 8.4% de otros especímenes, 6.4% en el líquido pleural, 4.1% en el líquido cefalorraquídeo y de 3.7% en orina. (Ver Tabla 1)

Tabla 1
Tuberculosis extrapulmonar según el sitio de infección y resultado de baciloscopia y cultivo.

<i>Sitio de infección</i>	<i>Baciloscopia</i>				<i>Cultivo</i>				<i>Total de Casos</i>	
	<i>Positiva</i>		<i>Negativa</i>		<i>Positivo</i>		<i>Negativo</i>		<i>Núm.</i>	<i>%</i>
	<i>Núm.</i>	<i>%</i>	<i>Núm.</i>	<i>%</i>	<i>Núm.</i>	<i>%</i>	<i>Núm.</i>	<i>%</i>		
<i>Pleural</i>	2	0.9	199	99	13	6.4	188	93.5	201	28.7
<i>Urinaria</i>	1	1.2	79	98.7	3	3.7	77	96.2	80	11.4
<i>Meníngea</i>	0	0	193	100	8	4.1	185	95.8	193	27.6
<i>Otros</i>	11	4.9	213	95	19	8.4	205	91.5	224	32.0
<i>Total</i>	14	2	684	98	43	6.1	655	93.8	698	100

Fuente: Directa

La sensibilidad de la baciloscopia para todas las muestras no pulmonares fue del 30.2%, Ic95 (17.7, 46.3), la especificidad del 99.8%, Ic95 (99.0, 100), el valor predictivo positivo de 92.9%, Ic95 (64.2, 99.6), y el valor predictivo negativo de 95.6%, Ic95 (93.7, 97.0). La sensibilidad de la baciloscopia para todas las muestras de esputo fue del 77.2%, Ic95 (70.0, 83.1), la especificidad del 99.7%, Ic95 (99.1, 99.9), el valor predictivo positivo de 97.8%, Ic95 (93.1, 99.4), y el valor predictivo negativo de 96.5%, Ic95 (95.2, 97.5). (Ver Tabla 2)

Tabla 2
Baciloscopia y cultivo de muestras no pulmonares.

		<i>Cultivo</i>		
		<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>	<i>Total</i>
<i>Baciloscopia</i>	<i>Positivo</i>	13	1	14
	<i>Negativo</i>	30	654	684
	<i>Total</i>	43	655	698

Fuente: Directa

Discusión y Conclusiones

Mientras que la baciloscopia es una prueba de tamizaje utilizada para detectar a los enfermos bacilíferos, prioridad en el control de la tuberculosis y que permite detectar al 70% de los casos, en este estudio se muestra que es capaz de detectar tan solo al 30% de los casos.

A pesar de que la baciloscopia es un método empleado para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar en donde los especímenes de esputo contienen cantidades considerables de bacilos, también se utiliza para el diagnóstico de la tuberculosis extra pulmonar con la diferencia de que en los diversos especímenes de las formas extrapulmonares el número de bacilos presentes es relativamente pequeño. Los resultados obtenidos nos permiten demostrar que existe una diferencia ($p < 0.05$) entre ambos tipos de muestras, las de esputo y las de origen no pulmonar respecto a la sensibilidad, en cuanto a la especificidad diagnóstica no existe diferencia ($p > 0.05$).

Aún y cuando se cuentan con métodos sofisticados como la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), esta no puede usarse en especímenes no pulmonares, porque puede rendir resultados falsos positivos y solo debe ser usado en esputo. El carácter serio de la tuberculosis extrapulmonar es frecuente debido a su diagnóstico tardío ya que su presentación en algunos sitios de infección la hace inaccesible y al número relativamente pequeño de bacilos presentes en los especímenes.(10)

Dentro de los especímenes no pulmonares, encontramos que otros tipos como secreciones de abscesos, ganglios linfáticos y otras muestras de tejidos incluidos en esta categoría, resultan positivos a la baciloscopia con mayor frecuencia que otros líquidos como los obtenidos por punción y la orina. Lo anterior tiene que ver con la cantidad de bacilos presentes en las muestras ya que se ha comprobado que para tener el 50% de probabilidad de observar un bacilo en cada 100 campos, requieren por lo menos 5 000 bacilos por mililitro de la muestra.

El cultivo muestra una gran capacidad diagnóstica en muestras no pulmonares ya que es capaz de detectar de 10 a 100 bacilos en el volumen sembrado.(11) La importancia de conocer la sensibilidad y la especificidad de la baciloscopia en especímenes de formas extrapulmonares de la tuberculosis, estriba en el hecho de que en muchas instituciones de atención médica y servicios de urgencias no cuentan con otros métodos diagnósticos de reconocida sensibilidad y especificidad como el cultivo.

Si bien la complejidad del cultivo y su costo resultan ser mayores que la baciloscopia, es mejor alternativa en comparación a otras técnicas sofisticadas. Por lo tanto, la baciloscopia no puede ser utilizada como única opción en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar y se debe utilizar el cultivo en todos los especímenes no pulmonares.

Resumen

La tuberculosis es una enfermedad que continúa siendo un problema serio de salud pública para el mundo y que causa millones de casos nuevos cada año, a pesar de que se puede prevenir y curar.

Se estima que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectado por *Mycobacterium tuberculosis*. Los especímenes de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar, fueron estudiados en el intervalo comprendido entre los meses de enero de 2000 a diciembre del 2001, en el Departamento de

Patología Clínica, del Hospital Universitario "Dr. José E. González", de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Nuevo León, México). Los pacientes estudiados fueron 1937, de los cuales 1239 aportaron muestras de esputo y 698 muestras no pulmonares. El cultivo muestra una gran capacidad diagnóstica en muestras no pulmonares ya que es capaz de detectar de 10 a 100 bacilos en el volumen sembrado. La importancia de conocer la sensibilidad y la especificidad de la baciloscopia en especímenes de formas extrapulmonares de la tuberculosis, estriba en el hecho de que en muchas instituciones de atención médica y servicios de urgencias no cuentan con otros métodos diagnósticos de reconocida sensibilidad y especificidad como el cultivo. Si bien la complejidad del cultivo y su costo resultan ser mayores que la baciloscopia, es mejor alternativa en comparación a otras técnicas sofisticadas. Por lo tanto, la baciloscopia no puede ser utilizada como única opción en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar y se debe utilizar el cultivo en todos los especímenes no pulmonares.

Palabras clave: Mycobacterium tuberculosis ,tuberculosis extrapulmonar, cultivo, baciloscopia.

Abstract

Tuberculosis is a disease that continues being a serious problem of Public Health for the world and it causes millions of new cases every year, although it can be prevented and cured. About one third of the world population is infected by *Mycobacterium tuberculosis*. Patients with clinical signs of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis were studied in the Department of Clinical Pathology at the University Hospital "Dr. José E. González" of the Autonomous University of Nuevo León (Nuevo León, México) from January 2000 to December 2001. Studied patients were 1937, from these, 1239 patients brought sputum samples and 698 patients gave nonpulmonary samples. The culture shows a big diagnostic capacity in nonpulmonary samples since it is able to detect from 10 to 100 bacillus. The importance of knowing the sensibility and specificity of baciloscopia in extrapulmonary tuberculosis samples depends on the fact that many medical attention and emergency service institutions don't have other diagnostic methods of sensibility and specificity like the culture. Although complexity and cost of the culture are bigger than baciloscopia, it is a better alternative. Therefore, baciloscopia can't be used as the only option in the extrapulmonary tuberculosis diagnosis and the culture should be used in all nonpulmonary samples.

Key words: Mycobacterium tuberculosis, extrapulmonary tuberculosis, culture, baciloscopia.

Referencias

1. World Health Organization 1997. Tratamiento de la tuberculosis: directrices para los programas nacionales. Segunda edición WHO/TB/97.220
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Control. WHO Report 2001. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/2001.287
Mendel, GL, R. Douglas, G Douglas y JE Bennett. 1991 Manual de Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica Ed. Panamericana 3ª edición, pp. 1986-2015

4. Organización Panamericana de la Salud. 1988. Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para la Bacteriología de la Tuberculosis Parte I La Muestra. El Examen Microscópico. OPS Nota Técnica Núm. 26/Rev. I
5. Richmond JY and RW McKinney 1993. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Publication No. CDC 93-8395. US Dept of Health and Human Services, Public Health Service, C for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health, ed3, pp 93-96.
6. Wanger, A., R. Clark, J. Bua, A. Edwards, and J. Ho. 1996. Comparison of MB/BacT and conventional methods for detection of mycobacterium species, abstr. U-40, p. 107. In Abstracts of the 96th General Meeting of the American Society for Microbiology 1996. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Organización Panamericana de la Salud,. 1988. Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para la Bacteriología de la Tuberculosis Parte II. El Cultivo OPS Nota Técnica Núm. 27/Rev. I
8. Koneman, EW., SD Allen, HM Sommers, HM 1985. Diagnóstico Microbiológico Ed. Panamericana
9. Vasakova M 1998 Extrapulmonary tuberculosis. Epidemiol Mikrobiol Immunol 47(1):23-6
10. Toman, K. 1980. Tuberculosis Detección de Casos y Quimioterapia. Preguntas y Respuestas OPS/OMS Publicación Científica Núm. 392