



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**“INCIDENCIA DE TUBERCULOSIS PULMONAR EN LA
POBLACIÓN DEL HOSPITAL PARA EL NIÑO POBLANO DE
ENERO- JUNIO DE 2014 POR MEDIO DE BACILOSCOPIA Y
CULTIVO”**

**TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICOFARMACOBIOLOGO**

Presenta:

María Soleil Trejo Salauz

Directora de Tesis:

Q. F. B. Virginia Lora Téllez

Asesor Interno:

M. C. Alejandro Cesar Ruíz Tagle

Mayo 2015

Índice

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	3
Introducción.....	4
Marco teórico.....	6
Marco de referencia.....	15
Planteamiento del problema.....	19
Justificación.....	20
Objetivos.....	21
Diseño de la investigación.....	22
Metodología.....	23
Resultados.....	35
Discusión.....	37
Conclusiones.....	38
Apéndice.....	39
Bibliografía.....	42

A mi familia que siempre ha estado conmigo apoyándome y haciendo que nunca deje de creer en mí, porque ellos son mi fortaleza y gracias a ellos jamás he dejado de luchar por mis sueños, aunque estemos lejos siempre los llevo en mi corazón.

A aquellas personas que con su ejemplo y entusiasmo, supieron colocar en mí la semilla de la investigación y las ganas de enfrentarme a algo nuevo, porque gracias a ellas emprendí nuevos retos y descubrí de que soy capaz.

Y a aquellos y aquellas que me dieron su apoyo incondicional cuando lo requería, gracias por escucharme, por preguntarme, por retarme y sacarme de mi confort y sacar lo mejor de mí porque sin esa voz de aliento no hubiera llegado hasta donde estoy.

Resumen

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa la cual puede cursar de forma subaguda o crónica, predomina a nivel pulmonar aunque también puede afectar otros órganos; esta es causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*. Las condiciones de hacinamiento favorecen que el agente etiológico se transmita de un hospedero enfermo a uno sano por la inhalación de gotas de secreción respiratorias que contienen al microorganismo, producidas en un acceso de tos, al hablar o estornudar; el cual al alcanzar la zona alveolar provoca el inicio de la infección. Los niños menores de 1 año tienen un 40% de posibilidades de que la enfermedad se disemine; y del 10-20% de desarrollar tuberculosis meníngea, mientras que los mayores de 5 años poseen solo un 5% de probabilidad de que se disemine y 0.5% de desarrollar tuberculosis meníngea. La mayoría de los niños son asintomáticos, aunque pueden presentar ciertas alteraciones como linfadenopatías hilar o mediastínica, derrame pleural, tuberculosis miliar; etc. El diagnóstico clínico está basado en las especificaciones de las diferentes organizaciones de salud pública, dentro de ellas se encuentran los criterios epidemiológicos, clínicos, radiológicos, histopatológicos y microbiológicos; el diagnóstico de tuberculosis pulmonar a nivel pediátrico es difícil de establecer y confirmar, sin embargo, es necesario apoyarlo en el laboratorio por medio de la baciloscopía, y así evitar el progreso de la enfermedad.

Los objetivos de este trabajo fueron determinar la incidencia de tuberculosis pulmonar en pacientes pediátricos del Hospital para el Niño Poblano de enero-junio de 2014, mediante las técnicas de baciloscopía y cultivo.

En el periodo en el que se realizó el trabajo, se estudiaron 31 pacientes diagnosticados inicialmente con enfermedad de vías respiratorias inferiores; de los cuales 58% corresponden al sexo masculino y 42% al sexo femenino. Se analizaron 107 muestras por la técnica de Petroff, la mayoría de muestras recibidas fueron de jugo gástrico (60%), mientras que las muestras de esputo y aspirado bronquial tuvieron un menor porcentaje (37 y 3% respectivamente).

Se realizaron tanto las baciloscopías como los cultivos de los 31 pacientes recibidos, los cuales resultaron negativos. Se obtuvo una incidencia de tuberculosis pulmonar en el Hospital para el Niño Poblano de enero-junio de 2014 de 0%.

Introducción

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa, generalmente de curso subagudo o crónico, que involucra diversos órganos o tejidos, predominando a nivel pulmonar y causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, así como también por las demás especies del género *Mycobacterium* incluidas en el complejo tuberculosis como agentes etiológicos atípicos.

A su vez la clasificación taxonómica de *Mycobacterium* se encuentra determinada de la siguiente manera: orden *Actinomycetales*, familia *Mycobacteraceae* y el género *Mycobacterium*.

En el complejo tuberculosis se encuentran englobadas aquellas micobacterias que son capaces de producir enfermedad semejante a la tuberculosis en animales y humanos, cuyo crecimiento en medios de cultivo es lento; dentro de este complejo se incluyen las especies: *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* y *M. mungi*.

Aunque los miembros del complejo tuberculosis infectan a otros primates y especies de mamíferos, el hombre es el único reservorio de estos microorganismos.

Existen evidencias paleopatológicas de tuberculosis espinal en esqueletos del neolítico y precolombinos y en restos del antiguo Egipto. Los médicos griegos de la antigüedad usaban el término *phthisis* para indicar el carácter consuntivo de la enfermedad; sin embargo, esta enfermedad no constituyó un problema importante hasta que las condiciones de hacinamiento de la vida urbana de las primeras épocas de la revolución industrial crearon las circunstancias epidemiológicas favorables para su propagación.

Los conceptos modernos acerca de la tuberculosis fueron desarrollados en la segunda mitad del siglo XIX como resultado de los logros médicos sobresalientes. En 1830 Schonlein y Laenec a través de estudios en autopsias demuestran la entidad clínica de la tuberculosis en las formas pulmonar y extrapulmonar, posteriormente Anton Ghon hace una extensa descripción de la tuberculosis primaria. En 1882 Roberto Koch realiza la identificación del agente etiológico y en 1898 Escherich establece la enfermedad en niños y realiza el primer diagnóstico radiológico de la enfermedad. Entre 1907 y 1910 Von Pirquet, Mantoux, Mandel y Moro desarrollan la prueba de tuberculina.

Epidemiológicamente, las condiciones de hacinamiento favorecen la propagación aerógena del agente infeccioso que se transmite al hospedero sano por inhalación de partículas infecciosas de secreciones respiratorias, las cuales, forman un aerosol al toser, estornudar o hablar el hospedero enfermo; y que son suficientemente pequeñas como para secarse mientras están suspendidas en el aire donde permanecen durante períodos prolongados, con libre acceso hacia las vías aéreas superiores e incluso, alcanzar las vías aéreas terminales (zona alveolar) del hospedero sano, en donde produce la replicación y se inicia la infección. De tal manera que, un acceso de tos puede producir 3,000 núcleos de diminutas gotas embebidas con gran cantidad de partículas infectivas, incrementándose esta carga microbiana al hablar durante 5 minutos y con el máximo alcanzado al estornudar.

Marco teórico

Toda vez que el agente etiológico de tuberculosis está ubicado anatómicamente en la zona alveolar, se estimulan respuestas tanto celulares como humorales; la protección contra la enfermedad está asociada a la actividad de los linfocitos T Th1, en la cual también interfieren los linfocitos T CD4+. El progreso de la enfermedad está asociado a una respuesta de los linfocitos T Th2 o por combinación de Th1 y Th2, típicamente un paciente inmunocompetente produce una respuesta de hipersensibilidad tipo retrasada (HTR), mediada por los linfocitos T, con lo cual se destruye a los macrófagos infectados, y junto con la producción de citosinas limitan la destrucción del tejido, producido por los linfocitos Th2. (Sánchez, 2008).

Después de que el bacilo llega al alveolo, las células dendríticas, epiteliales, y los macrófagos alveolares son los encargados de producir citosinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral α (FNT α), IL-1, IL-69 e IL-10; éstas, son encargadas de reclutar y activar a los macrófagos para que puedan limitar o eliminar por completo al bacilo. Las citosinas producen la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1 y selectina E en los leucocitos, y con esto los leucocitos migran al sitio de la lesión. En el inicio de la infección quimiocinas como IL-18 atraen a los neutrófilos los cuales fagocitan a las micobacterias, pero no poseen la capacidad para eliminarlas; solo contienen a las bacterias mientras los macrófagos son activados. Las quimiocinas también dirigen a los linfocitos T CD4+ hacia el sitio donde se está desarrollando la HTR, y así el factor de crecimiento transformante beta (TGF β), que es producido por los macrófagos activados promueve el desarrollo del nódulo de Ghon. Con esto se inicia la migración de los linfocitos Th1, y su posterior activación genera la producción de IL-2 y factor de necrosis tumoral beta (TNF β) los cuales son importantes para la total eliminación del bacilo. (Sánchez, 2008).

En niños menores de un año existe un 40% de riesgo de que la enfermedad se disemine; y del 10 al 20% de desarrollar tuberculosis meníngea, mientras que los mayores de cinco años tan solo poseen el 5% de probabilidad de que se disemine y el 0.5% de desarrollar tuberculosis meníngea. Esto refleja la incapacidad del sistema inmunitario pediátrico de desarrollar una respuesta protectora, ya que en los primeros años de vida, el número de macrófagos alveolares es limitado, y sus funciones de fagocitosis y reclutamiento celular son deficientes, también la cantidad de células dendríticas esta disminuida y desarrollan la capacidad de presentar antígenos hasta los 2 años de edad. (Panqueva, 2000)

La forma anatómica que corresponde a la primoinfección, se compone de un chancro o nódulo de Ghon, el cual es un foco caseificado que mide de 0.5-2 cm de

diámetro compuesto por tres regiones, en la región central hay células gigantes y multinucleadas con bacilos, la región media posee células epiteloideas pálidas y, por último la periférica que está formada por fibroblastos, linfocitos y monocitos. Puede situarse en cualquier lóbulo, pero existe una mayor preferencia por el lóbulo derecho que por el izquierdo, y las localizaciones mejor ventiladas como la parte baja del lóbulo superior y la parte alta del inferior; raras veces es múltiple o bilateral. En la mayoría de los casos este foco suele curarse, formando alrededor del nódulo un tejido granulomatoso que evoluciona a fibrosis y encapsulamiento, pudiendo llegar a calcificarse. (Rossman, 1996).

Existen diferentes factores de riesgo que pueden originar que la infección se reactive, como son una falla en el balance humoral y celular del hospedero, así la tuberculosis de reactivación suele desarrollarse después de un periodo de latencia y se origina desde el pulmón a partir de los bronquios, afectando a cualquier segmento pulmonar, teniendo predilección importante por segmentos apicales o posteriores de los lóbulos superiores, o segmentos superiores de los lóbulos inferiores. (Díaz, 2005).

La mayoría de los niños que cursan con la enfermedad son asintomáticos, pero también pueden presentarse ciertas alteraciones en los estudios de imagenología como son: linfadenopatía hilar, linfadenopatía mediastínica, infiltrados segmentarios o lobares, neumonía consolidada, atelectasia, derrame pleural o tuberculosis miliar. Cuando hay tuberculosis extrapulmonar pueden presentarse linfadenopatía cervical, afección ósea y articular y meningitis tuberculosa; en niños menores de 5 años puede presentarse tuberculosis miliar y meningitis tuberculosa, incluyendo neumonía. (Rossman, 1996)

La tuberculosis extrapulmonar suele presentarse en alrededor de un 20% de los lactantes y niños enfermos de tuberculosis pulmonar; la enfermedad temprana se caracteriza por linfadenopatía o afección miliar, meníngea, ósea, articular o renal. En la tuberculosis pulmonar progresiva hay presencia de fiebre, tos, pérdida de peso y estertores húmedos en el área dañada. La enfermedad miliar se presenta al romperse un foco caseoso en el interior de un vaso sanguíneo, caracterizado por fiebre y pérdida de peso sin síntomas pulmonares. (Rossman, 1996)

Debido a que la tuberculosis es endémica en la mayoría de los países del mundo, la lucha contra esta se basa primordialmente en la aplicación de la vacuna BCG, la cual, no evita la primoinfección con *M. tuberculosis* pero previene las formas más graves de la enfermedad como son la tuberculosis meníngea y miliar. La denominación de BCG fue dada debido a que en 1921 Albert Calmette y Camille Guérin desarrollaron la vacuna a partir de bacilos vivos atenuados de una cepa de *Mycobacterium bovis*, con la cual observaron que se confería cierta protección al

ser aplicada, así fue denominada BCG (Bacilo de Calmette y Guerin). Actualmente la BCG es un liofilizado de una cepa de *M. bovis* atenuada; existen cinco cepas utilizadas actualmente, estas son la Pasteur, Danesa, Glaxo, Tokio y Montreal. (Sánchez, 2008).

Esta vacuna, es un inmunógeno muy complejo y produce respuestas inmunes igualmente complejas; principalmente de tipo celular. Después de que la vacuna ha sido inoculada, esta sigue el mismo trayecto que *M. tuberculosis* al ser fagocitado por los macrófagos y estos presentan los antígenos a los linfocitos T, y cuando se reconoce el antígeno este libera IL-1, provocando la proliferación de los linfocitos T específicos. Por otro lado los macrófagos también liberan IL-1, la cual activa a los linfocitos y con esto logran expresar receptores para IL-2, produciéndose una transformación blástica de los linfocitos CD-4 que son capaces de reconocer al mismo antígeno. Así cuando los linfocitos son activados liberan linfocinas que activan a los macrófagos alveolares para destruir los bacilos intracelulares. (Sánchez, 2008).

En nuestro país se aplica desde la década de los sesenta; la vacunación se realiza en todos los niños recién nacidos o antes de cumplir un año de edad, con una sola dosis de 0.1 ml; la cual debe administrarse en el deltoides por vía intradérmica produciendo una induración la cual evoluciona y cura, para dejar una cicatriz redonda ligeramente excavada. (Secretaría de Salud, 2002).

Un punto muy importante que debe de considerarse en nuestra nación es que debido al hecho de que México es un país endémico de tuberculosis, la vacunación con BCG sigue aplicándose como lo dicta la norma, y esta producirá en la mayor parte de las ocasiones un resultado mayor a 1 mm en la prueba PPD, esto es debido a múltiples factores, dentro de los que se encuentran el estado inmunológico de la persona, el antecedente de haber estado o no en contacto con un paciente enfermo de tuberculosis, entre otras. Así, aquellas personas que laboran en el área de la salud presentan reacciones con resultados mayores a uno debido a que están en contacto con pacientes enfermos de tuberculosis, esto solo señala que el sujeto está infectado, pero no es un indicador de que está presentando la enfermedad. A su vez, existen diferentes pruebas de la tuberculina que son utilizadas para detectar la infección por *M. tuberculosis*, como son la OT (tuberculina vieja), y el PPD (Derivado Proteico Purificado); el cual es actualmente el más utilizado. Dicha prueba se administra mediante la técnica de Mantoux; aplicando 0.1 ml de la solución PPD en la parte posterior del antebrazo por vía intradérmica. (Rossman, 1996)

Lo que ocurre inmunológicamente al realizar esta prueba es que, una parte desaparece por vía linfática y el resto permanece en donde fue inoculado, dicho

remanente es fagocitado por los macrófagos; así cuando el hospedero ha tenido contacto efectivo con micobacterias, se expresa proliferación y sensibilización de linfocitos T como respuesta inmunológica posterior a dicho contacto, con el consecuente estado infeccioso bajo esta circunstancia, los macrófagos (que han fagocitado PPD) estimulan a los linfocitos (ya sensibilizados) provocando una reacción de hipersensibilidad tipo retrasada (HTR) la cual requiere alrededor de 24-48 horas para manifestarse, se produce una reacción inflamatoria (edema), hay proliferación de linfocitos T específicos para el antígeno y se descargan linfocinas produciendo una acumulación mayor de células (eritema). (Rossman, 1996)

La lectura de la prueba debe realizarse a las 72 horas después de su aplicación, se debe localizar y tocar la induración para sentir los bordes y con ayuda de una regla flexible se mide el diámetro de la induración, por último los resultados deben anotarse en milímetros. La prueba se interpreta de la siguiente manera: (Castellanos, 2010).

- ∞ De 0 a 9 mm se considera no reactor
- ∞ De 10 o más se considera reactor
- ∞ En menores de 5 años, en recién nacidos, en niños y niñas con desnutrición y personas inmunodeprimidas se considera reactor al que presenta 5 o más mm de induración

La OMS (Organización Mundial de la Salud) en el año de 1993 declaró a la tuberculosis como una emergencia de salud pública mundial; por lo que implemento diferentes estrategias para combatirla como son: diagnóstico por medio de baciloscopía, tratamiento con fármacos antituberculosos, de primera línea y un sistema estandarizado para reportar el número de casos de tuberculosis en los sistemas de salud nacionales. (Baddeley, 2013)

Las características fisiológicas y bioquímicas del género *Mycobacterium*, a excepción de la especie *lepreae*, incluye bacilos pleomórficos de 1 a 5 μm de largo, delgados y ligeramente curvos, en disposición aislada o en grupos con ordenamiento paralelo (cordón serpiginoso), inmóviles, no esporulados, resistentes a la desecación, al frío y a la congelación; pueden sobrevivir por periodos prolongados en esputo seco. Tienen un tiempo de generación de 8-24 horas y crecen en medios sólidos como: Middlebrook 7H10/11 o Löwenstein-Jensen; en Löwenstein-Jensen, crecen en forma de grumos con una coloración crema, el crecimiento puede ser detectado al transcurrir de 2-6 semanas de la siembra. (Jawetz, 2001).

Los constituyentes de la pared micobacteriana son determinantes de las propiedades biológicas y patogénicas que caracterizan al género, ya que contiene

de 20-60% de lípidos unidos a proteínas y carbohidratos que le confieren elevada resistencia a la luz, álcali y ácidos, y particularmente a la acción bactericida de los anticuerpos. La capacidad de formar complejos micólicos estables con ciertos colorantes arylmetanos (carbol-fucsina, auramina rodamina); le confieren a la micobacteria coloraciones que permiten su identificación en líquidos, exudados o tejidos del hospedero. El alto contenido de lípidos (ácidos micólicos), no es exclusivo de éstas, sino que también están presentes en géneros como *Nocardia*, *Corynebacterium* y *Rhodococcus*; esta propiedad otorga a las micobacterias la resistencia a la decoloración con mezclas de alcohol-ácido y por esto se les asigna el nombre de Bacilos Ácido Alcohol Resistentes (BAAR). (Jawetz, 2001).

Así la tinción de Ziehl-Neelsen con carbol fucsina o fucsina fenicada los exhibe de color rojo, o bien verde-amarillo fluorescente bajo luz ultravioleta por reacción con auramina-rodamina. La identificación del microorganismo depende, por tanto, de sus propiedades tintoriales, pero también de sus características morfológicas, bioquímicas y metabólicas. Aunque de crecimiento lento, la temperatura óptima de cultivo de la mayoría de las especies del género es de 35-40⁰ C. (Cole, 2005).

Existen tres constituyentes de la capa externa de la pared micobacteriana que están asociados a factores de patogenicidad y virulencia, los cuales son: factor cordón, sulfolípidos y micósidos. El factor cordón produce que las micobacterias tengan una disposición en forma de cadenas o serpentina, este es producido por el componente de la pared trehalosa 6´6-dimicolato, el cual origina una inhibición de la succinato deshidrogenasa produciendo toxicidad para los leucocitos. Los sulfolípidos, son los responsables de impedir la fusión fagosoma-lisosoma, con lo cual se potencia al factor cordón. Micósidos, estos le confieren protección a la bacteria contra un ambiente intracelular hostil. (Rossman, 1996)

Otro mecanismo de patogenicidad conocido es el lipoarabinomano, el cual también es un constituyente principal de la pared celular de la micobacteria, éste, tiene la capacidad de intensificar la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), e inhibir la producción de interferon gamma (IFN γ), además de que es depredador de los radicales libres de oxígeno, protegiendo a la micobacteria de la toxicidad producida por el fagolisosoma. Por otro lado, se ha encontrado una proteína secretada por *M. tuberculosis*, el antígeno 85A, el cual se une a la fibronectina evitando que esta active al linfocito T unido a su receptor, y de este modo impide la activación de los macrófagos. (Sánchez, 2008).

Debido a la estructura lipídica de la membrana de *M. tuberculosis*, esta se considera como una bacteria resistente a la mayoría de los antibióticos, esto es generado por la concentración de más de un 60% de lípidos que actúan como barrera casi impermeable, únicamente solutos hidrofílicos penetran a través de

porinas. Los fármacos activos contra esta micobacteria se dividen en fármacos de primera línea y fármacos de segunda línea, dentro de los fármacos de primera línea se encuentran la isoniacida y la rifampicina, esta última ha originado grandes preocupaciones, debido a que *M. tuberculosis* ha desarrollado un mecanismo de resistencia a ésta, con lo cual hace que el tratamiento de inicio pueda fallar. (Quirós, 2001).

El mecanismo de acción que posee la rifampicina para actuar contra micobacterias es simple, actúa sobre la ARN polimerasa, inhibiendo la síntesis del ARN mensajero, y por consiguiente la síntesis de ácido nucleico; por lo tanto al inhibir dichos procesos la rifampicina conduce a la muerte celular. La bacteria ha desarrollado un mecanismo de resistencia a la rifampicina provocado por una mutación en el gen *rpoB*, el cual codifica para la subunidad β del ARN polimerasa; las alteraciones causadas por dicha mutación impiden que la rifampicina se una adecuadamente a el ARN polimerasa y por lo tanto su efecto se inhibe. (Morbidoni, 2006).

Diferentes investigaciones han demostrado que las mutaciones en el gen *rpoB* son las promotoras de la resistencia a la rifampicina en un 95% de los casos, dichas mutaciones se encuentra en un segmento de aproximadamente 81 pb (pares de bases) y las más frecuentes son causadas por inserciones o deleciones. (Bermúdez, 2005).

En lo que respecta al tratamiento, la quimioterapia antifímica es diferente respecto a otros microorganismos, debido al largo periodo de duplicación de la bacteria, a sus componentes estructurales los cuales le confieren poca permeabilidad a sustancias, y a su capacidad de permanecer en el hospedador en estado de latencia. (Mandel, 2010). Así, en la década de los 50 la quimioterapia redujo la transmisión de tuberculosis, sin embargo en los años 80 es declarada emergencia de salud pública mundial debido al surgimiento de cepas resistentes a los fármacos usados en el tratamiento para la tuberculosis; por este motivo en el año de 1991 la OMS implementó la estrategia de tratamiento multidrogas para evitar aquellas cepas resistentes a algunos fármacos utilizados. Actualmente la OMS sigue implementando las llamadas estrategias DOTS (tratamiento corto supervisado), apoyándose en fármacos de primera línea los cuales tienen propiedades bactericidas y en estos se incluyen a la isoniacida, rifampicina, pirazinamida, y estreptomycin; incluyendo al etambutol en casos nuevos, el cual tiene efecto bacteriostático. (Arráiz, 2007).

Para nuestro país los fármacos manejados son: isoniacida, rifampicina, pirazinamida, y etambutol. Se utilizan en el tratamiento primario que dura 2 meses,

posteriormente se administra isoniacida y rifampicina durante 4-6 meses como fase de sostén. (Secretaría de Salud, 2013).

El éxito del tratamiento antifímico es evaluado y supervisado mediante el estudio de baciloscopía, el cual se realiza con el análisis de una muestra biológica emitida mensualmente durante y hasta terminar el tratamiento; observándose paulatinamente la disminución en la cuenta de bacilos y la ausencia completa de ellos, y también es vigilada mediante radiografías y cuadro clínico. (Secretaría de Salud, 2013).

La mayoría de los niños que cursan con la enfermedad son asintomáticos, pero también pueden presentarse ciertas alteraciones en los estudios de imagenología como son: linfadenopatía hiliar, linfadenopatía mediastínica, infiltrados segmentarios o lobares, neumonía consolidada, atelectasia, derrame pleural o tuberculosis miliar. Cuando hay tuberculosis extrapulmonar pueden presentarse linfadenopatía cervical, afección ósea y articular y meningitis tuberculosa; en niños menores de 5 años puede presentarse tuberculosis miliar y meningitis tuberculosa, incluyendo neumonía. (Rossman, 1996)

La tuberculosis extrapulmonar suele presentarse en alrededor de un 20% de los lactantes y niños enfermos de tuberculosis pulmonar; la enfermedad temprana se caracteriza por linfadenopatía o afección miliar, meníngea, ósea, articular o renal. (Panqueva, 2000). En la tuberculosis pulmonar progresiva hay presencia de fiebre, tos, pérdida de peso y estertores húmedos en el área dañada. La enfermedad miliar se presenta al romperse un foco caseoso en el interior de un vaso sanguíneo, caracterizado por fiebre y pérdida de peso sin síntomas pulmonares. (Rossman, 1996)

Para realizar el diagnóstico clínico y definirlo como caso de tuberculosis de acuerdo a las especificaciones de las organizaciones de salud pública; deben incluirse criterios epidemiológicos, clínicos, radiológicos, histopatológicos y microbiológicos. (Panqueva, 2000).

La OMS realiza dos distinciones para aclarar diferencias en cuanto al diagnóstico realizado en el laboratorio y el diagnóstico que efectúa el médico, y los define de la siguiente manera: (OMS, 2013).

Caso de TB bacteriológicamente confirmado: aquella muestra biológica con baciloscopía, cultivo o prueba rápida (técnicas moleculares) positiva.

Caso de TB clínicamente diagnosticado: aquel que no cumple con los criterios para la confirmación bacteriológica, pero que ha sido diagnosticado de acuerdo a la base en anomalías en radiografías o histología sugestivas, o casos

extrapulmonares sin confirmación del laboratorio, pero diagnosticados como TB activa por un Médico el cual ha decidido someter al paciente bajo tratamiento. (OMS, 2013).

En nuestro país la NOM-006-SSA2-2013. Para la prevención y control de la tuberculosis, los define de la siguiente manera:

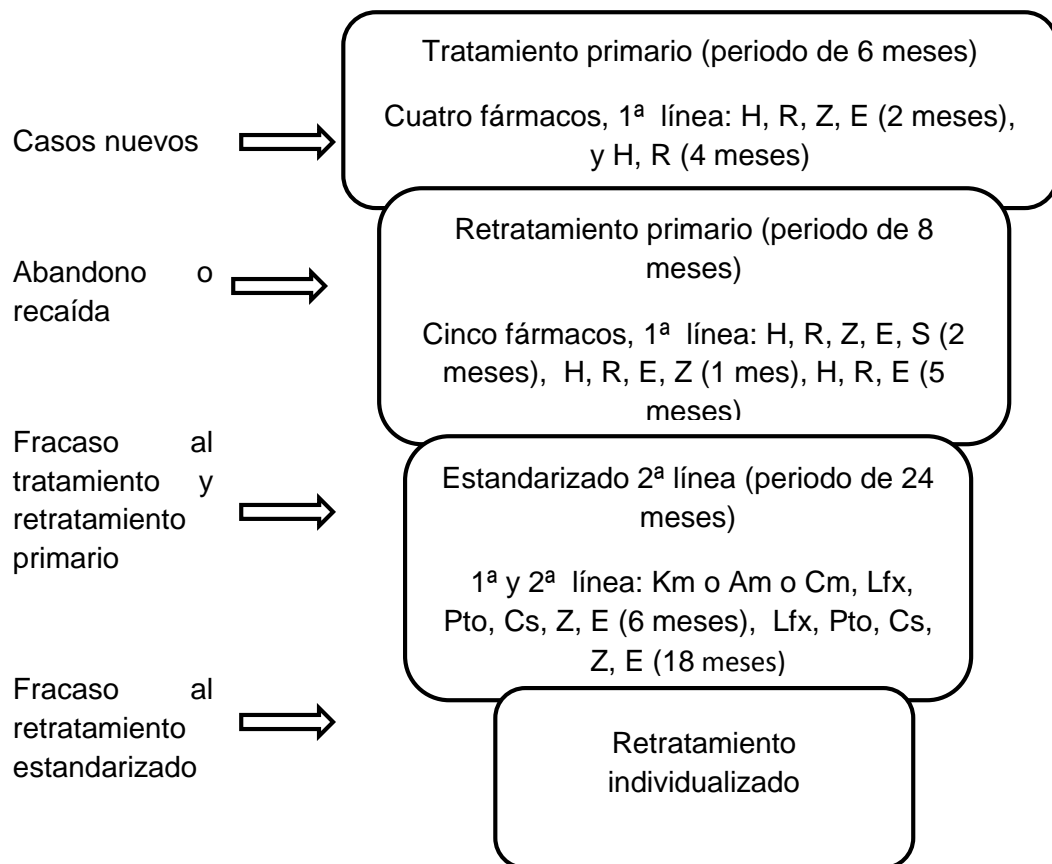
Caso de TB: aquella persona a la que se le diagnostica con tuberculosis pulmonar o extrapulmonar, el cual debe ser confirmado.

Caso de TB confirmado: persona a la que se le ha identificado el complejo *M. tuberculosis* en cualquier muestra, ya sea por medio de cultivo, baciloscopía o molecularmente.

Caso de TB no confirmado: aquella que posee signos y síntomas clínicos y respuesta terapéutica sugerentes de TB, pero cuya baciloscopía, cultivo o métodos moleculares fueron negativos.

El diagnóstico microbiológico se realiza mediante el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* en agar de Löwenstein-Jensen con tratamiento previo de descontaminación y concentración para muestras clínicas con alta densidad microbiana. (Blancarte, 1992). A su vez, la población pediátrica representa todo un desafío diagnóstico, pues la mayoría de estos pacientes no tienen las facultades para poder expectorar y aunado al carácter paucibacilar limitan realizar un cultivo exitoso a partir de estas muestras. En general las muestras para diagnosticar tuberculosis pulmonar en niños pueden ser: esputo espontaneo o esputo inducido (jugo gástrico y aspirado bronquial), y para diagnosticar tuberculosis generalizada; líquido cefalorraquídeo, orina o punción ganglionar entre otros. (Panqueva, 2000)

De acuerdo a la NOM-006-SSA2-2013, para realizar un tratamiento adecuado este será administrado de acuerdo a las siguientes formas: primario acortado, retratamiento primario con fármacos de primera línea, retratamiento estandarizado con fármacos de segunda línea para tuberculosis multiresistente. Esto de acuerdo al diagnóstico y al modo en que el paciente ha llevado el tratamiento farmacológico. Para esto se estableció una estrategia para que se cumpla con éxito terapéutico (ver figura 1)



1ª línea H: isoniacida, R: rifampicina, Z: pirazinamida, E: etambutol, S: estreptomicina, 2ª línea Km: kanamicina, Am: amikacina, Cm: capreomicina, Lfx: levofloxacin, Pto: protionamina, Cs: ciclocerina.

Figura 1. Pirámide de éxito terapéutico. (Tomado de Secretaría de Salud, 2013).

Todo paciente que fracase al tratamiento primario, los que abandonen, recaigan o fracasen a un retratamiento con fármacos de primera línea, deben ser evaluados por el Comité Estatal de Farmacorresistencia (COEFAR) el cual establecerá las acciones a seguir en casos con tuberculosis resistente a fármacos. (Secretaría de Salud, 2013).

Marco de referencia

- ∞ El incremento de tuberculosis durante las últimas décadas en la población pediátrica se atribuye a diversos condicionantes, dentro de los que se encuentran la crisis económica mundial, que conlleva a la reducción del presupuesto en los programas de salud, y por ende a la pobreza, el hacinamiento, la desnutrición, el abuso de sustancias, y el aumento de VIH en la población infantil de países con alta incidencia de tuberculosis. (Lozano, 2003). La situación se complica aun más por la aparición de la resistencia a los fármacos antituberculosos, que es un factor importante que ha empezado a aparecer no solo en los países de tercer mundo sino que ha ido ganando terreno en todos los países del mundo, lo cual nos hace enfrentarnos a un gran problema de salud pública mundial. (Panqueva, 2000).
- ∞ Desde 1997 la OMS publica cada año un reporte con toda la información epidemiológica de la tuberculosis, llamado Informe Mundial de Tuberculosis, el reporte más reciente “Global Tuberculosis Report 2013” público que la tuberculosis es la segunda causa de muerte alrededor del mundo después del VIH. En este reporte se encuentra información sobre tuberculosis haciendo recuento desde el año 1990, estadísticas y datos también del año 2012, de todas las regiones del mundo que están asociadas a la OMS, así, los casos nuevos de tuberculosis alrededor del mundo reportados son 8.6 millones, a las vez hubo 1.3 millones de muertes por tuberculosis, la mayoría de casos en hombres. Se detectaron 530 000 nuevos casos de tuberculosis en niños, y alrededor de 74 000 muertes por ésta en la población. Los países de América Latina con mayor incidencia son (de mayor a menor número): Brasil, México, Bolivia, Perú y Colombia. El informe también reportó que en Brasil los nuevos casos de tuberculosis en niñas menores de 15 años fueron 303 y en niños 277; mientras que en México los nuevos casos en niños fueron 133 y en niñas 134. (Baddeley, 2013).
- ∞ Según el Plan Mundial para detener la Tuberculosis 2006-2015 (The Global Plan to Stop TB 2006-2015) para el año 2015 la incidencia de la tuberculosis debe estar reducida, y por lo menos disminuir a la mitad las tasas de mortalidad por tuberculosis con respecto al año 1990. Los países con mayor incidencia de tuberculosis son: India, China, Sur África, Indonesia, Pakistán, Bangladesh, Filipinas, Etiopía, República del Congo y Birmania. India con la más alta incidencia y Birmania con la menor. (Caines, 2006).

- ☞ Un estudio realizado en el año 2011 en el Hospital de la Universidad de Jimma Etiopía, en la Unidad de Salud Infantil reportó que de un total de 121 pacientes con un diagnóstico de tuberculosis, un 45% se encontraba en la edad entre 1-5 años y un 46% de 6-10 años, el sexo con mayor número de casos reportados fue el masculino con un 57% frente a un 43% en el sexo femenino. (Workalemahu, 2013)

- ☞ Rodríguez reporta en un estudio para determinar la epidemiología de la tuberculosis pediátrica en España en los años de 2005-2009, 39 775 casos de tuberculosis, de los cuales 2 690 eran pediátricos y en niños se encontró una mayor proporción de localizaciones pulmonares (84%). Comparando el año 2005 con el 2008 ellos encontraron que hubo un incremento significativo de riesgo de la tuberculosis pediátrica. De todos los caso en el año 2009 el 52% fueron menores de 5 años y un 48% estaban entre 5-14 años. (Rodríguez, 2012).

- ☞ Un estudio realizado en el 2002 en Argentina por investigadores del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y el Sector de Epidemiología asociadas a otras instituciones, indica que la incidencia en el año 2000 en niños menores de 5 años fue de 24.3 por cada 100 000 habitantes, y del total de los casos representan un 16.9% (niños y niñas de 0-14 años). Los casos extrapulmonares constituyeron el 6.5% del total de casos, con las formas más graves que es meníngea y diseminada (Niseli, 2002).

- ☞ En Bogotá en el año 2013 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) lanzó un artículo sobre la importancia de la detección oportuna de la tuberculosis para reducir la mortalidad en niños y niñas, así los casos de tuberculosis al año en Colombia se encuentran en los 12 000, para el año 2012 se reportaron 674 casos de los cuales, 88 eran en niños de hasta 1 año, 231 entre 1-4 años, 156 para los de 5-9 años, y 199 para el grupo de 10-14 años; en este caso el 14.9% eran de población indígena. (OPS, 2013)

- ☞ Un trabajo realizado en México por Médicos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Ismael Cosío Villegas” (INER) reporta la importancia y el cómo diagnosticar tuberculosis en niños, revela que en el 2010 el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica se presentaron 18 848 casos de tuberculosis, 4.9% de ellos en menores de 15 años, donde las

localizaciones más frecuentes fueron pulmonar 81.6%, ganglionar 5.7%, y meníngea 1.6%, y la edad con mayor número de casos es de 1-5 años. Recomendado el diagnóstico basándose en una suma de elementos, entre los cuales se encuentran el antecedente de contacto, la prueba PPD positiva, los estudios de imagen anormales y el hallazgo de *M. tuberculosis* por baciloscopía o histopatología. (Anleu, 2012).

- ∞ Las estadísticas hechas por el Instituto Nacional de Estadística Geográfica (INEGI) en colaboración con el Sistema Nacional para la Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), indican que en el 2010 los estados con mayor incidencia de tuberculosis pulmonar en México fueron: Baja California, Guerrero, y Tamaulipas; para la tuberculosis extrapulmonar y meníngea: Baja California. (Secretaría de Salud, 2012).
- ∞ Para el año 2012 el INEGI publicó su informe junto con el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) en donde se reporta que los estados con mayor incidencia en tuberculosis pulmonar en niños menores de 1 año, son: Baja California, Colima, Guerrero, Sonora; en niños de 1-4 años: Baja California, Guerrero, de 5-9 años: Baja California, Colima, 10-14 años: Baja California, Sonora; 15-19 años: Baja California, Baja California Sur, Colima, Guerrero, Nuevo León, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas. En la tuberculosis extrapulmonar los estados con mayor incidencia en niños menores de 1 año: Baja California; en niños de 1-4 años: Baja California, Nayarit; 5-9 años Baja California y Jalisco, 10-14 años Baja California; 15-19 años: Baja California, Nayarit. Tuberculosis meníngea en niños menores de 1 año: Aguascalientes y Baja California; de 1-4 años: Baja California; 5-9 años: Yucatán; 10-14 años: Baja California y Michoacán; 15-19 años: Aguascalientes y Baja California. En Puebla la incidencia en el 2012 de tuberculosis pulmonar fue: para niños menores de 1 año de 2.39 por cada 100 000 habitantes; en niños de 1-4 años de 1.01; de 5-9 años 0.49; de 10-14 años de 0.80; de 15-19 años de 2.31, así en la tuberculosis extrapulmonar la incidencia en niños menores de 1 año fue de 1.60 por cada 100 000 habitantes; en niños de 1-4 años de 0.40; en niños 5-9 años de 0.65; para los de 10-14 años de 0.96; y para los que tienen 15-19 años fue de 1.48. Y para la tuberculosis meníngea la incidencia en todas las edades fue de 0. (Secretaría de Salud, 2012).
- ∞ Un estudio realizado por Lora y cols. de 1995-2014 en el Hospital para el Niño Poblano sobre hospederos pediátricos con afección aguda o crónica en vías respiratorias inferiores, reportó una incidencia de tuberculosis pulmonar de 7.8% diagnosticada mediante estudios de baciloscopía y

cultivo en jugo gástrico principalmente, con tendencia hacia el grupo de edad escolar entre 5-15 años; con diseminación hacia sitios anatómicos extrapulmonares en 3.6% del total de casos, presentando como factor de riesgo común la ausencia de BCG. (Lora, 2014).

Planteamiento del problema

El diagnóstico de tuberculosis pulmonar en pacientes pediátricos es difícil de establecer y confirmar debido al complicado acceso a las muestras clínicas disponibles para estudio; sin embargo, es necesario apoyar el diagnóstico clínico de dicha enfermedad a través del estudio de baciloscopía, debido a que con frecuencia la evolución clínica cursa desfavorablemente avanzando a otros sitios anatómicos importantes como sistema nervioso central, riñón, bazo e hígado, con evidente compromiso de la calidad de vida entre la población de riesgo ya mencionada. Así mismo, los hospederos pediátricos tanto infectados como enfermos representan un indicador de transmisión de tuberculosis vía hospedero adulto enfermo evidenciando las dimensiones epidemiológicas de esta enfermedad.

Por lo anterior se realizó un estudio descriptivo para conocer ¿cuál es la incidencia de tuberculosis pulmonar en una población pediátrica, como es en el Hospital para el Niño Poblano?

Justificación

La participación del laboratorio clínico como apoyo en el diagnóstico preciso de tuberculosis pulmonar en pacientes pediátricos es de gran importancia; ya que este diagnóstico refleja una incidencia presuntiva de tuberculosis entre la población adulta establecida en la relación de contacto con la población pediátrica, la cual a su vez, no solo es susceptible de adquirir la enfermedad pulmonar, sino también de desarrollar en alta frecuencia tuberculosis diseminada de evolución clínica desfavorable.

Objetivos

General

- ∞ Determinar la incidencia de tuberculosis pulmonar en pacientes pediátricos del “Hospital para el Niño Poblano” de enero-junio 2014.

Particulares

- ∞ Realizar la técnica de baciloscopía como apoyo diagnóstico de laboratorio en tuberculosis pulmonar infantil.
- ∞ Realizar la técnica de cultivo como apoyo diagnóstico de laboratorio en tuberculosis pulmonar infantil.

Diseño de la investigación

- ∞ Estudio transversal, observacional y descriptivo.
- ∞ Universo de estudio: 107 muestras de pacientes de edad pediátrica con diagnóstico y sintomatología de vías respiratorias bajas aguda o crónica del Hospital para el Niño Poblano en el periodo de enero a junio de 2014.

Criterios de inclusión:

- ∞ Muestras clínicas de esputo espontáneo e inducido (jugo gástrico y aspirado bronquial) de pacientes en edad pediátrica con diagnóstico y sintomatología de enfermedad de vías respiratorias bajas aguda o crónica.

Criterios de exclusión:

- ∞ Pacientes que no tienen edad pediátrica.
- ∞ Muestras clínicas procedentes de pacientes en edad pediátrica sin diagnóstico ni sintomatología de enfermedad de vías respiratorias bajas aguda o crónica.
- ∞ Muestras que posean las características adecuadas para su procesamiento, en el caso del esputo que no contenga gran cantidad de saliva y jugo gástrico obtenido con el ayuno adecuado.

Metodología

Las técnicas y metodologías utilizadas en este trabajo serán realizadas con el siguiente material y reactivos:

Material

- ☞ Frascos de plástico estériles, transparentes con tapa de rosca y cierre hermético.
- ☞ Jeringas estériles de plástico con aguja.
- ☞ Trampa de Lukens.
- ☞ Tubos de vidrio con tapa de rosca y cierre hermético esterilizados.
- ☞ Vasos de precipitados esterilizados (250 ml).
- ☞ Pipetas de transferencia estériles y desechables.
- ☞ Aplicadores de madera esterilizados.
- ☞ Tiras reactivas para pH 0-14.
- ☞ Guantes de látex.
- ☞ Cubrebocas N95.
- ☞ Anteojos protectores.
- ☞ Bata tipo cirujano estéril.
- ☞ Portaobjetos con pantalla esmerilada.
- ☞ Gabinete de bioseguridad tipo II clase A
- ☞ Mechero tipo Bunsen .
- ☞ Mezclador automático.
- ☞ Gradilla.
- ☞ Contenedores para RPBI (capacidad 3 L).
- ☞ Centrifuga con accesorios para seguridad biológica (contención de aerosoles).
- ☞ Balanza.
- ☞ Incubadora a 37°C atmosfera ambiente.
- ☞ Microscopio óptico.
- ☞ Hoja de registro de lectura de baciloscopía.
- ☞ Pinzas.
- ☞ Puente de tinción.

Reactivos

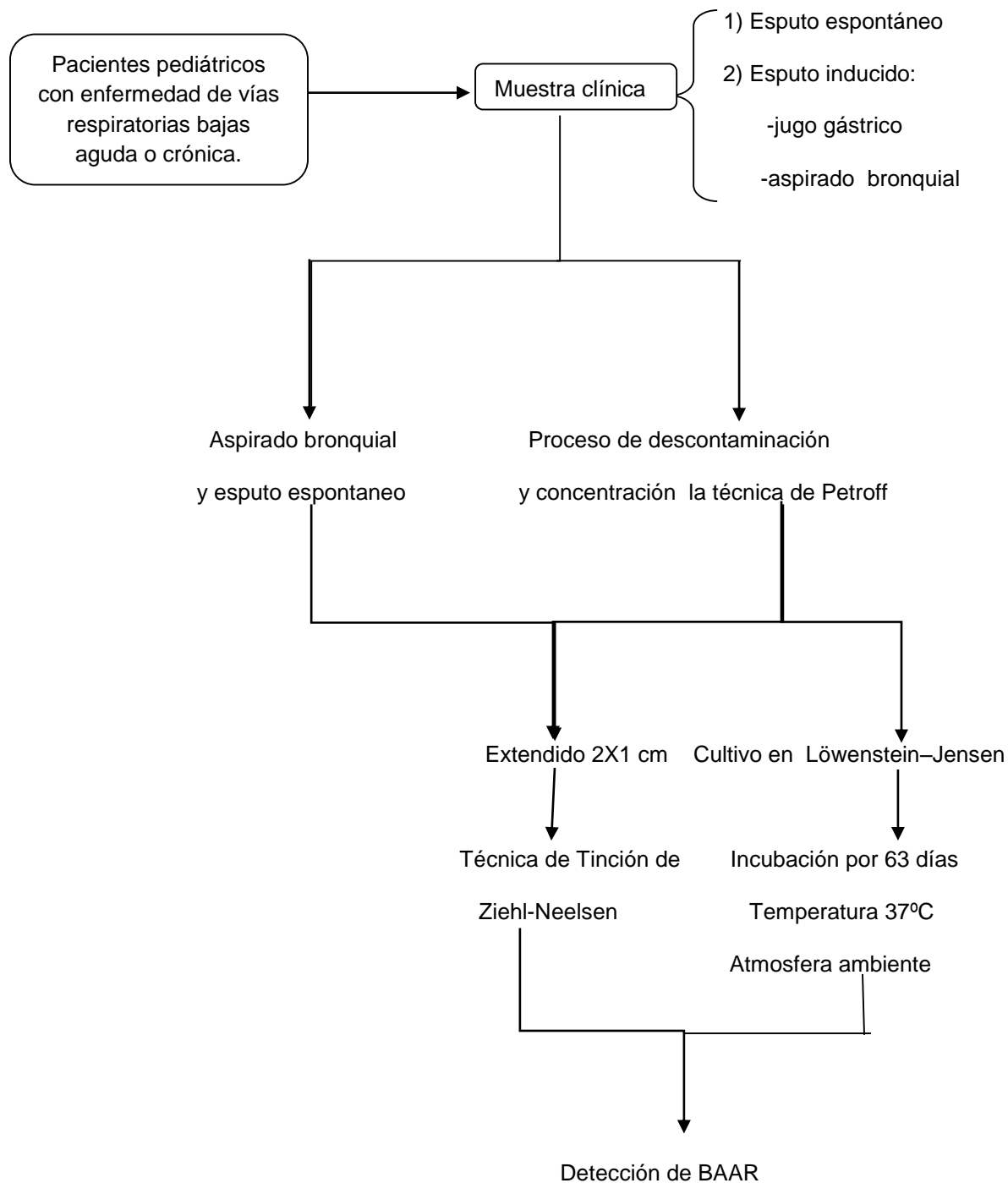
- ☞ NaOH al 4% con rojo de fenol (indicador de pH).
- ☞ Solución amortiguadora de fosfatos.
- ☞ Agua destilada estéril.
- ☞ HCl 1N.
- ☞ Solución acuosa de fenol al 5%.

- ☞ Solución acuosa de hipoclorito de sodio al 6%.
- ☞ Agar preparado de Löwenstein–Jensen BD-BBL™.
- ☞ Solución de fucsina fenicada.
- ☞ Solución de alcohol-ácido.
- ☞ Solución de azul de metileno.
- ☞ Torundas de algodón con alcohol etílico.

BACILOSCOPIA Y CULTIVO

El diagrama 1 muestra la metodología general a seguir para la realización de este trabajo en el laboratorio:

Diagrama 1. Diagrama general de trabajo.



Interpretación: criterios OMS, OPS, InDRE

Recolección y manejo de muestras para el estudio de baciloscopía:

Se realizó la recolección de muestra clínica para baciloscopía en serie de tres muestras mínimo, para estudio de baciloscopía de diagnóstico, una por día; y muestra única para estudio de baciloscopía de control. Se recomendó realizar la recolección de la primera muestra en el momento en el cual se había identificado al paciente tosedor crónico. Como alternativa, se refrigeró la muestra a 4°C sólo en el caso de esputo espontáneo.

Esputo espontáneo

Se recomendó al paciente realizar la recolección de la muestra clínica en un espacio ventilado o en ambiente exterior. El paciente realizó una aspiración profunda y expulsó directamente el contenido respiratorio en el recipiente que se le haya asignado. La muestra clínica se depositó en un recipiente de plástico estéril, desechable, de boca ancha y tapa de cierre hermético. Se identificó la muestra clínica por medio de los datos respectivos del paciente: nombre, edad, sexo, fecha de recolección, expediente, Institución de salud y tipo de muestra clínica.

Esputo inducido

Jugo gástrico:

Se indicó al paciente, ayuno de 4-6 horas en lactantes menores y ayuno de 8-12 horas en pacientes mayores de 3 años. Esto debido al riesgo de broncoaspiración del contenido gástrico durante el procedimiento de recolección de muestra clínica y por contaminación de esta última.

Se aspiró el contenido gástrico con la ayuda de sonda nasogástrica introducida en la cavidad orofaríngea continuando el trayecto a través de laringe hasta estómago. Se canalizó el contenido gástrico en una jeringa de al menos 5 cm de capacidad y se colocó el tapón de la jeringa.

Se identificó la muestra clínica por medio de los datos respectivos del paciente: nombre, edad, sexo, fecha de recolección, expediente, institución de salud y tipo de muestra clínica.

Aspirado bronquial:

Se realizó con las medidas de asepsia adecuadas en el instrumental. Se recolectaron secreciones a través de broncoscopio o con el sistema de aspiración,

pudiendo introducir de 3-5 mL de suero fisiológico previo a la aspiración. Se colocó en la trampa de Lukens. Se realizó el registro de datos de las muestras en la bitácora.

Baciloscopía

Se utilizaron portaobjetos nuevos no reutilizables. En el extremo izquierdo correspondiente a $\frac{1}{4}$ de la superficie total del portaobjetos, se anotaron los datos referentes a la muestra clínica que se analiza:

- ∞ iniciales del nombre del paciente
- ∞ iniciales de identificación del laboratorio que realiza el examen
- ∞ número de control e identificación de la muestra clínica a examinar

Se realizaron extendidos de 2 cm de ancho x 1 cm de largo, en el centro del portaobjetos. Si es el caso del tipo de muestra clínica esputo espontáneo, el extendido se realizó recolectando una alícuota representativa (mucopurulenta) de la muestra clínica con la ayuda de un aplicador de madera.

En el caso de muestra clínica esputo inducido, el extendido se realiza recolectando una alícuota del concentrado obtenido posterior a la técnica de Petroff con la ayuda de una pipeta de transferencia estéril y desechable.

Realizado el extendido se dejó secar al aire por 24 horas. Se fijó el frotis al calor de la flama del mechero bunsen. Se tiñó con técnica de Ziehl-Neelsen.

Se realizó la lectura de los frotis con microscopía óptica simple en aumento 100x.

Se leyeron 100 campos, abarcando toda la laminilla y evitando leer el mismo campo.

Se dividió cada campo en 4, y leyó en sentido de las manecillas del reloj.

Se anotaron los resultados en una cuadrícula con 100 cuadros y se reportaron los resultados como se indica en la tabla 1:

Tabla 1. Clasificación de los resultados en la baciloscopía	
Negativo (-)	No se observan bacilos ácido-alcohol resistentes en 100 campos microscópicos.
De 1 a 9 BAAR*	Informar el número de bacilos en 100 campos observados.
Positivo (+)	Menos de un bacilo por campo en promedio (de 10 a 99 bacilos), en 100 campos observados.
Positivo (++)	De uno a diez bacilos por campo en promedio en 50 campos observados.
Positivo (+++)	Más de 10 bacilos por campo en 20 campos observados.
* Bacilos Ácido Alcohol Resistentes	

Tomado de Balandro, 2003.

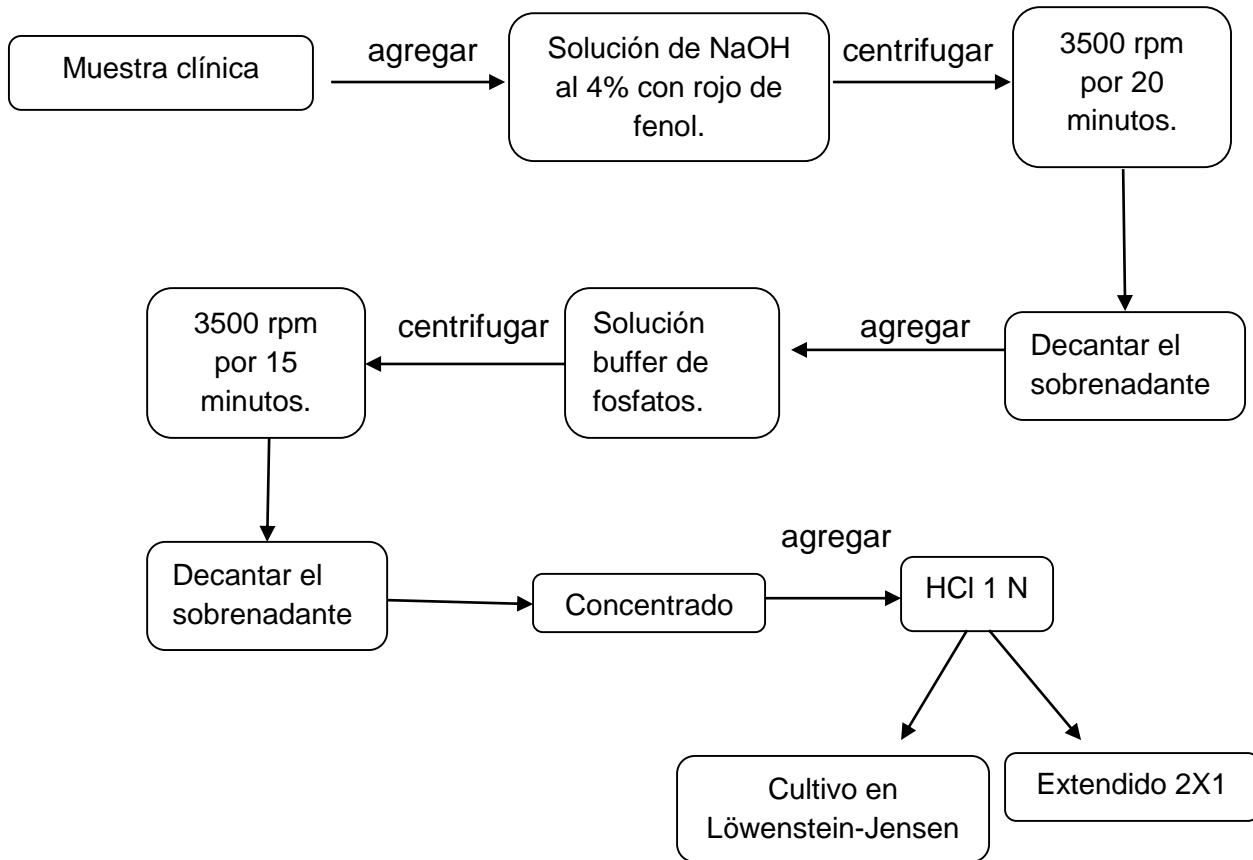
Técnica de Petroff

Esta técnica es utilizada para eliminar a aquellas bacterias de la flora normal provenientes de los sitios anatómicos no estériles durante la obtención de las muestras y para concentrar a los bacilos contenidos en la muestra (ver diagrama 2):

- ☞ El procedimiento se realizó en una cabina de bioseguridad tipo II clase A.
- ☞ Se calzó la vestimenta y dispositivos de protección indicados para el operador en el manejo de muestras biológico-infecciosas de riesgo nivel III. (Ver apéndice A).
- ☞ Se colocó en una gradilla el número de tubos estériles a ocupar dependiendo el número de muestras, identificados con el número de control de laboratorio.
- ☞ Para esputo espontáneo y aspirado bronquial se utilizó una pipeta de transferencia estéril y desechable, con la que se tomó un volumen de 2 mL de la muestra, se vació su contenido en el tubo de vidrio correspondiente a cada muestra.
- ☞ En el caso de jugo gástrico, se destapó la jeringa que contenía la muestra y se vació con cuidado en un tubo de vidrio evitando la formación de aerosoles.
- ☞ Se agregó a cada tubo un volumen de NaOH al 4% igual al de su contenido y se cerró.

- ☞ Se agitó el tubo en un mezclador automático 20 segundos, hasta que la parte mucopurulenta se desintegró.
- ☞ Se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos.
- ☞ Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante en un contenedor para RPBI a prueba de salpicaduras.
- ☞ Se agregó buffer de fosfatos en la misma cantidad del sedimento.
- ☞ Se homogenizó en el mezclador automático por 10 segundos.
- ☞ Se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos.
- ☞ Se desechó el sobrenadante y se neutralizó el sedimento con HCl 1N, cuidando que éste posea un pH entre 6.5-7.2, midiendo con tiras reactivas para pH.
- ☞ Se colocó en la gradilla los tubos necesarios con medio de cultivo Löwentein-Jensen, identificados adecuadamente.
- ☞ Se tomó con una pipeta desechable estéril el producto neutralizado, y se sembró en el tubo de 3-4 gotas.
- ☞ Se flamearon los tubos antes y después de cerrarse.
- ☞ Se colocaron los tubos sembrados en una bandeja con fondo inclinado.
- ☞ Se incubaron los tubos en una estufa a 37^o C, atmosfera aerobia por un tiempo de 63 días.
- ☞ Se realizaron lecturas del cultivo a las 24, 48 y 72 horas para detectar contaminantes y alteraciones en el medio de cultivo por pH extremo.
- ☞ Las revisiones posteriores se hicieron a los 7, 30, y 63 días; informando en cada ocasión los cultivos que fueron positivos.
- ☞ Los tubos negativos solo se informan a los 63 días de incubación.
- ☞ En general, las colonias de *M. tuberculosis* son rugosas, color crema y con aspecto de coliflor y se desarrollan en la superficie del medio.
- ☞ En caso de observar crecimiento, se analiza realizando un extendido del aislamiento y se tiñó con Ziehl-Neelsen para corroborar la reacción característica de ácido alcohol resistencia como dato de identificación presuntiva del género *Mycobacterium*.

Diagrama 2. Técnica de concentración de Petroff



Identificación de las especies del complejo tuberculosis

Para realizar la identificación de *M. tuberculosis* el laboratorio se apoya en diferentes procedimientos, dentro de los que se encuentra: determinación de la tasa de crecimiento, producción de pigmento, morfología macroscópica de las colonias y reacciones a las pruebas bioquímicas, estos son estándares de referencia; en la tabla 2 se muestran las diferentes pruebas para realizar su identificación:

Tabla 2. Características para la identificación de micobacterias. Tomado de Mandel, 2010.

<i>Mycobacterium</i>	T°C	TASA DE CRECIMIENTO	PIGMENTO		NIACINA	REDUCCIÓN NITRATOS	CATALASA		HIDRÓLISIS TWEEN 80	UREASA
			☐	•			25°C	68°C		
<i>tuberculosis</i>	37°C	≥ 15 días	AM		+	+	+	-	-/+	+
<i>africanum</i>	37°C	≥ 31 días	AM	AM	V	V	+	-	-	+
<i>bovis</i>	37°C	≥24 días	AM	AM	V	-	+	-	-	+
<i>ulcerans</i>	32°C	≥28 días	AM	AM	-	-	+	+	-	+
<i>kansasii</i>	37°C	≥15 días	A	AM	-	+	+	+	+	+
<i>avium</i>	37°C	≥15 días	AM	AM	-	-	+	+	-	-
<i>fortuitum</i>	37°C	≤10 días	AM	AM	-	+	+	+	+/-	
<i>chelonei</i>	37°C	≤10 días	AM	AM	V	-	+	+	-	+
<i>smegmatis</i>	37°C	≤10 días	A	AC	-	+	+	+/-	+	+
		☐ Luz • Oscuridad	AM: Amarillo mate		A: amarillo	AC: Amarillo claro		V: variable		

Determinación de las características del cultivo

- ☞ Se observan las características de morfología colonial, formación de pigmento en luz y oscuridad, temperatura óptima y tasa de crecimiento. (ver diagrama 3).
- ☞ En la cabina de seguridad con el mechero encendido, se toma una porción de una colonia del medio de cultivo el cual será sometido a su identificación y se realiza una suspensión en solución salina estéril a escala 1 McFarland.
- ☞ Se inoculan 0.2 mL de la suspensión en cada uno de cinco tubos con agar Löwenstein-Jensen y se incuban a las siguientes temperaturas 20-25°C, 32-33°C, 42°C, 37°C, 37°C cubierto en papel carbón.
- ☞ Realizar lecturas de los cultivos sembrados cada 8 días.

Niacina

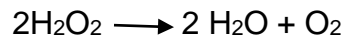
La niacina es un subproducto del metabolismo de las micobacterias el cual es transformado en niacina ribonucleótido por la mayoría de micobacterias excepto las especies *tuberculosis* y *bovis* ocasionalmente, al no ser transformada la

niacina, se acumula en el medio de cultivo. La prueba se basa en la detección de la presencia o ausencia de niacina en el medio, y esta se realiza al mezclar una solución de bromuro de cianógeno que reacciona con la niacina existente en presencia de una solución alcohólica de o-toluidina.

La presencia de niacina se interpreta como POSITIVA con la observación del desarrollo de color amarillo.

Catalasa

Todas la micobacterias, excepto las mutantes isoniacido-resistentes poseen la capacidad de sintetizar catalasa, ésta cataliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno, mediante la siguiente reacción:



La actividad de la catalasa es inhibida a 68°C en las especies de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, mientras que en las otras especies su actividad persiste.

Se prepara una suspensión del crecimiento con solución buffer por duplicado. El ensayo se realiza con solución de peróxido de hidrógeno al 30% más una solución detergente de Tween 80 al 10% para lograr la dispersión de las micobacterias. La prueba se realiza a temperatura ambiente y a 68°C en baño María.

La interpretación positiva de la prueba es indicada por la producción de burbujas.

Reducción de nitratos a nitritos

Algunas micobacterias pueden utilizar los nitratos como fuentes de nitrógeno, reemplazando a las sales de amonio. *M. tuberculosis* posee una enzima en su membrana llamada nitrato reductasa la cual reduce el nitrato (NO₃) a nitrito (NO₂), la reducción de los nitratos puede ser identificada por la producción de un colorante azo de la siguiente manera:

Se realiza una suspensión del crecimiento de micobacterias en 2 mL de solución acuosa de nitrato de sodio 0.01 M y se incuba esta solución por 2 horas a 37°C. Se agregan 2 gotas de HCl diluido 1:1 en agua y posteriormente 2 gotas de solución acuosa de sulfanilamida al 0.22%. Finalmente se agregan 2 gotas de solución acuosa de clorhidrato de N-Naftil etilen-diamina 0.1%.

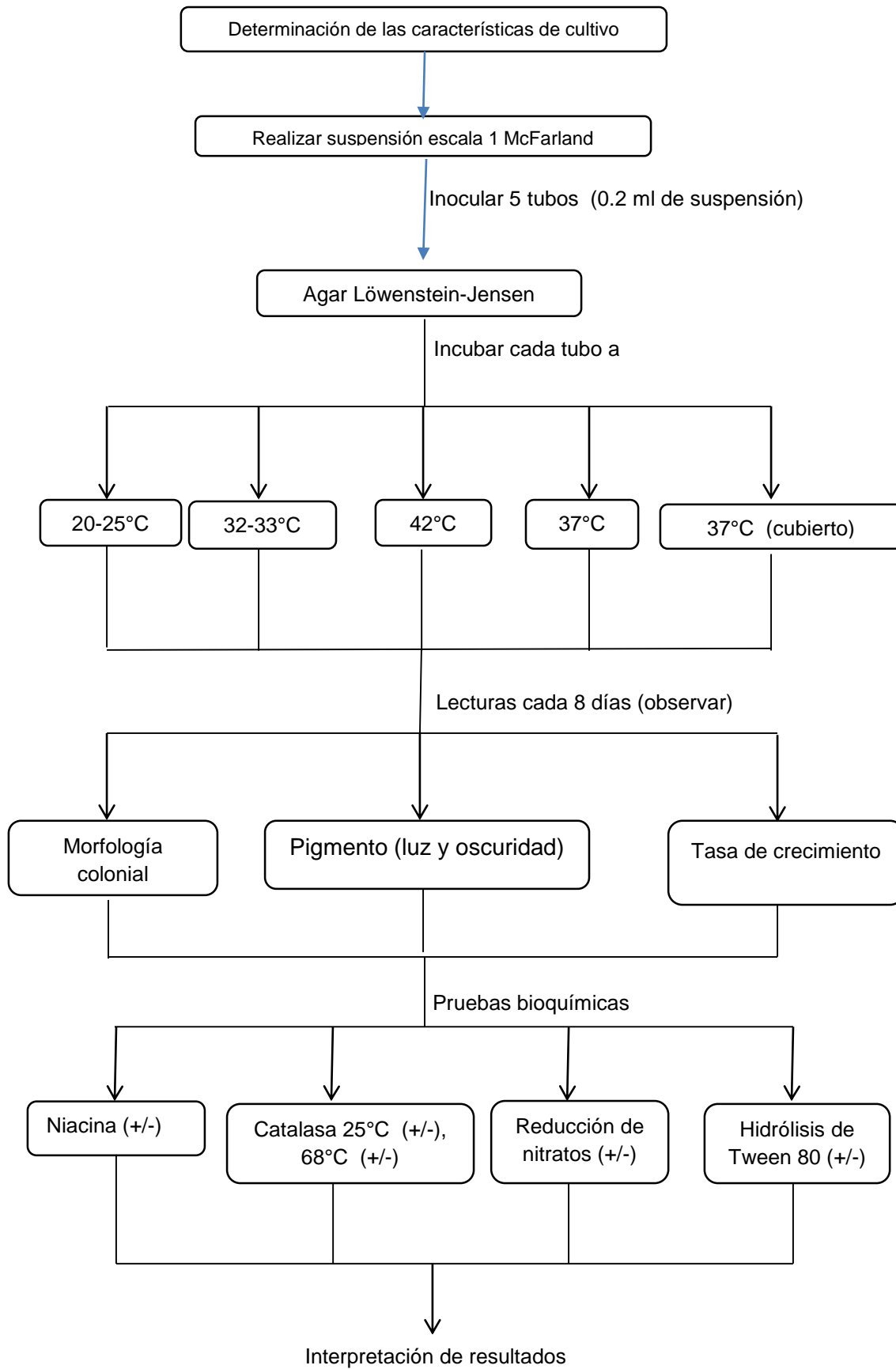
La interpretación de la prueba es positiva al observar el desarrollo de color rojo variable en intensidad.

Hidrólisis de Tween 80

La reacción de la hidrólisis de Tween 80 está determinada por la presencia de una lipasa que solo se encuentra en ciertas micobacterias, donde su hidrólisis produce como productos el ácido oleico y el sorbitol poliexetilado. La identificación de estos productos se realiza mediante un indicador de pH, la técnica se describe a continuación.

Se realiza una suspensión del crecimiento de micobacterias en 4 mL de solución compuesta de buffer de fosfatos, rojo neutro y Tween 80 (mono-oleato de polioxietilensorbitán), esta se incuba a 37°C y se realizan lecturas a los 5 y 10 días sin exponer a la luz. Se interpreta la prueba como positiva ante el desarrollo de color rosa variable en intensidad y negativo ante la persistencia del color ámbar original de la solución.

Diagrama 3. Técnicas a realizar para la identificación de micobacterias



Detección de especie: consultar tabla 2.

Resultados

En el periodo comprendido de enero a junio de 2014 se estudiaron 31 pacientes, quienes tuvieron como diagnóstico inicial enfermedad de vías respiratorias inferiores, de esos, 13 pacientes corresponden al sexo femenino y 18 al sexo masculino. (ver gráfico 1).

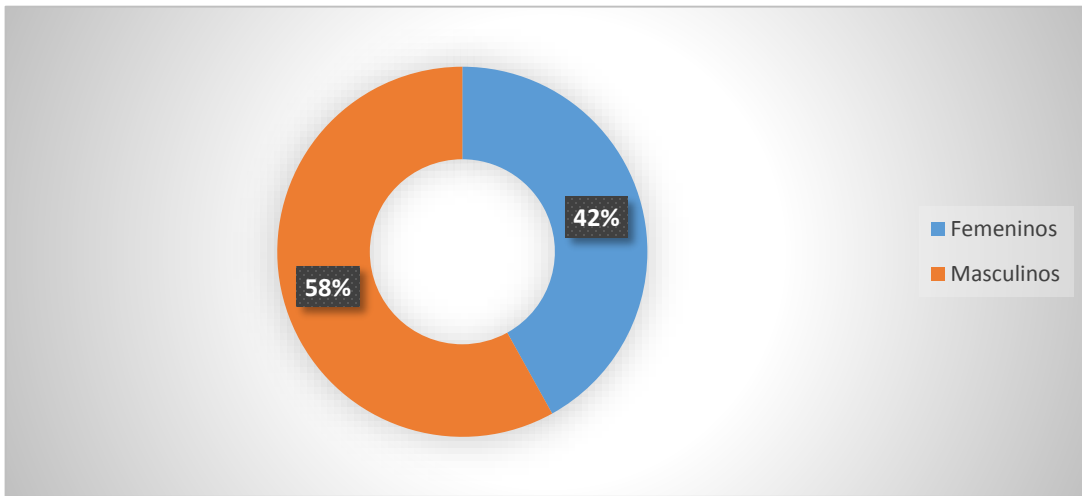


Gráfico 1. Pacientes recibidos en el periodo de enero-junio de 2014.

De los 31 pacientes, se analizaron un total de 107 muestras por la técnica de Petroff, la mayor cantidad de muestras recibidas fueron de jugo gástrico (60%) y el tipo de muestra que reportó menor número fue aspirado bronquial (3%). (ver gráfico 2.)

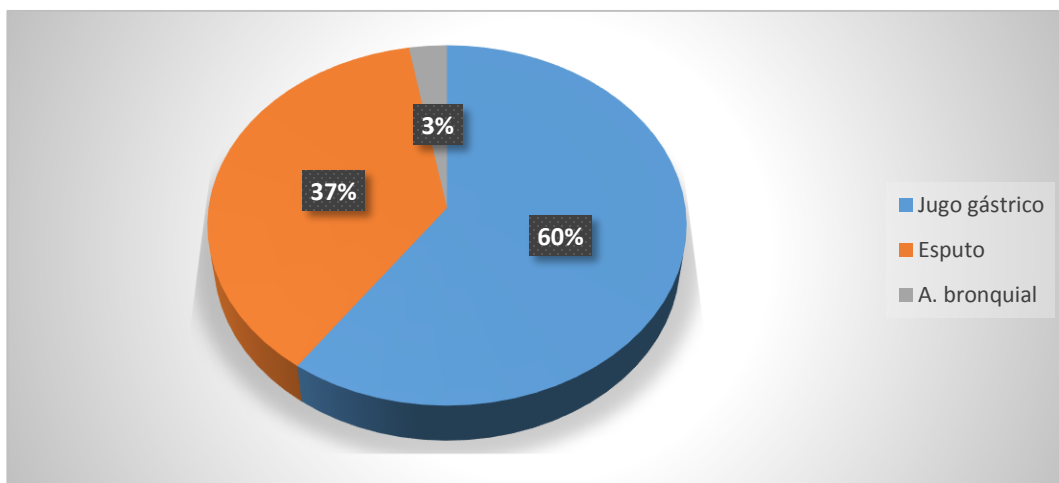


Gráfico 2. Tipo de muestra analizada en el periodo de enero-junio de 2014.

El análisis de las 107 muestras por el método de concentración de Petroff, junto con la realización de las baciloscopias y cultivos correspondientes, determinó que tanto las baciloscopias como los cultivos realizados, arrojaron resultados negativos de todas ellas (ver gráfico 3).

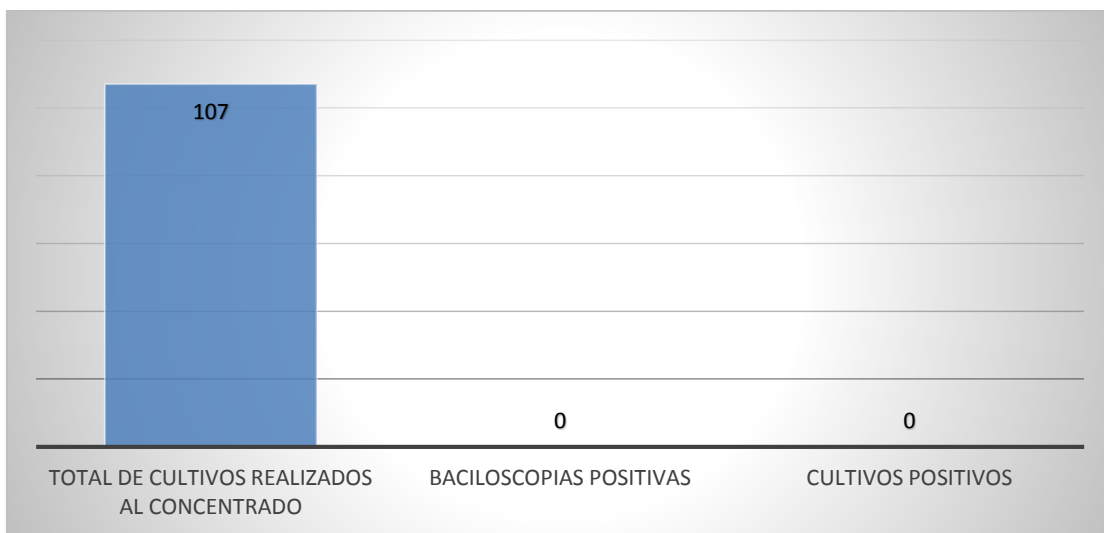


Gráfico 3. Muestras positivas en el periodo de enero-junio de 2014.

Por lo tanto la incidencia de tuberculosis pulmonar en la población estudiada fue del 0%.

Discusión

De acuerdo a los datos obtenidos en el periodo de enero a junio de 2014, se obtuvo una incidencia de la población estudiada de 0%, esto se debe a que tanto en las baciloscopías como en los cultivos se obtuvieron resultados negativos; se deben de tomar en cuenta múltiples factores que pueden hacer que dicha incidencia no sea correcta, esto puede deberse principalmente a que al realizar las técnicas tanto de baciloscopía como la de concentración de Petroff, y el cultivo, se pudieron haber cometido errores tales como: errores en la ejecución de la metodología, desde técnica de decantación de sobrenadante, selección de alícuota no representativa para un adecuado frotis, técnica incorrecta de tinción, lectura inadecuada en la observación microscópica, falta de control en el pH y carga microbiana en el concentrado obtenido para cultivo; entre otros probables. Asimismo los datos del año 2014 reportados en el estudio realizado en un periodo de 1995-2014 por Lora y cols. informaron un incremento en la incidencia de tuberculosis en la población del Hospital para el Niño Poblano.

Si bien el jugo gástrico representa la mejor alternativa como muestra biológica de estudio para establecer el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en población pediátrica; también le es atribuible un alto grado de dificultad en el análisis microbiológico para evidenciar al agente etiológico, esto es considerando la escasa carga de bacilos de Koch que resisten el pH estomacal adverso, permaneciendo viables a expensas del control inmediato del medio ácido; precisión en el proceso de descontaminación y concentración, a fin de no afectar la viabilidad de *Mycobacterium spp* y simultáneamente obtener los dos criterios de laboratorio que sustentan el diagnóstico, es decir, la observación microscópica y crecimiento microbiano. De tal forma que la densidad habitual en número de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en una muestra de jugo gástrico procesada por la técnica de Petroff, concentra no más de 10 BAAR en un extendido de 1x2 cm para ser advertidos por el ojo humano.

Por lo anterior, es evidente que se requiere conocimiento, además de destreza, dominio de la técnica y experiencia para el analista, sin menoscabo de las facultades de inherentes a un analista principiante.

Conclusiones

- ∞ Se realizó la determinación de la incidencia de tuberculosis pulmonar en la población del Hospital para el Niño Poblano de enero-junio de 2014 obteniéndose un resultado de 0%.
- ∞ Se realizaron las baciloscopias de los 31 pacientes recibidos en el periodo de enero a junio de 2014, obteniéndose un resultado negativo.
- ∞ Se realizaron 107 cultivos de los 31 pacientes recibidos, los cuales resultaron negativos.
- ∞ Es importante la capacitación del personal dedicado a realizar el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio ya que este desempeña un rol importante al momento de realizar el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en la población pediátrica y general.

Apéndice

Requerimientos de bioseguridad para un laboratorio nivel III

El laboratorio de contención nivel III, está concebido para trabajar con microorganismos del grupo de riesgo 3 (patógenos que suelen causar enfermedades graves a la población humana y a los animales, pero que generalmente no se propagan de un individuo a otro); con grandes volúmenes de microorganismo del grupo de riesgo 2 (patógenos que provocan enfermedades humanas o animales, pero con una probabilidad baja de entrañar un riesgo grave al personal de laboratorio); o por entrañar un mayor riesgo de difusión de aerosoles. (OMS, 2005).

En el caso del laboratorio de microbiología del Hospital para el Niño Poblano se incluyen todas las características anteriores, por lo que es clasificado como laboratorio nivel de bioseguridad III. (Gilpin, 2013).

Requisitos y forma de trabajo:

1. El símbolo de riesgo biológico debe estar expuesto en las puertas de acceso al laboratorio, especificando el nivel de bioseguridad y el nombre del supervisor del laboratorio; con acceso restringido.
2. Toda manipulación de un material potencialmente infeccioso (muestras de baciloscopia) debe realizarse en una cabina de bioseguridad.
3. Cabina o gabinete de seguridad clase II tipo A: con esta se evita la exposición de aerosoles y salpicaduras; posee un flujo mínimo de aire hacia el interior, filtros HEPA en el interior para que el aire sea expulsado al exterior.
4. De ser posible la cabina de seguridad debe estar en un cuarto separado dentro del laboratorio para trabajar adecuadamente, evitando contaminación por el flujo de aire externo o alejada de los lugares de paso o cruce de corrientes.
5. Antes y después de los procedimientos, la campana debe ser limpiada con alcohol al 70% con una gasa, para evitar dejar pelusa o restos de desinfectante.
6. Recipientes herméticos y de material rígido para la eliminación de material punzocortante.
7. Autoclave automática o manual con el diseño apropiado para el Hospital.
8. Los dispositivos de pipeteo deben ser desechables y estériles, si son pipetas automáticas deben permanecer dentro del área solamente, y al usarlas evitar la formación de aerosoles.

9. La zona de trabajo para las baciloscopías debe de estar en un área separada.
10. Los líquidos contaminados deberán desinfectarse para ser eliminados con una solución de fenol al 5%.
11. El personal debe portar el equipo de protección adecuado: batas o monos con abertura trasera y puño ajustable (bata tipo cirujano desechable), calzado cerrado, gafas de seguridad, cubrebocas (respirador) de seguridad N95, guantes de látex desechables.
12. Debe haber un lavabo para asearse las manos de forma adecuada, antes y después de cada procedimiento.
13. El sistema de ventilación debe tener un flujo de aire unidireccional.
14. Si se utilizan centrifugas estas requieren estar equipadas con rotores de contención y cierre hermético para evitar la salida y exposición de los aerosoles.
15. En el caso del laboratorio para tuberculosis, es preferible utilizar palillos desechables para hacer el frotis haciendo movimientos lentos y suaves para no crear aerosoles.
16. En el caso del contenedor del sobrenadante resultado de la centrifugación, este deberá ser alto de modo que evite alguna salpicadura (contenedor para RPBI capacidad de 3 L) y contener una solución de hipoclorito de sodio con agua en una proporción 1:10.
17. Todo cultivo positivo con *M. tuberculosis*, debe tratarse en autoclave antes de su eliminación.
18. En el caso de las laminillas, las negativas pueden colocarse dentro de un contenedor rígido con una solución de hipoclorito y agua, para que estas puedan ser reutilizadas; en el caso de las laminillas positivas serán previamente descontaminadas en autoclave y después eliminadas.
19. La disposición de los desechos se hará de acuerdo a la NOM -087 ECOL - SSA1-2002 como se indica en la Tabla 3

Tabla 3. Disposición de RPBI de acuerdo al estado físico y tipo de recipiente

Tipo de residuos	Estado físico	Envasado	Color
Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo
Residuos no anatómicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Punzocortantes	Sólidos	Recipientes herméticos	Rojo

20. El personal estará debidamente informado y capacitado con la normativa y forma de trabajo para un laboratorio de nivel de bioseguridad III, este también presentara informes de revisiones y análisis de su estado de salud completas periódicamente, para asegurar que éste se encuentra y ha trabajado en las condiciones adecuadas en el laboratorio.

Bibliografía

1. Anleu, D. I. (2012). Tuberculosis infantil ¿Cómo diagnosticarla? *Arch Argent Pediatr*, 144-151.
2. Arráiz, R. B. (2007). Evaluación de un ensayo de RPC múltiple para diferenciar micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en un laboratorio de referencia. *Revista Chilena de Infectología*, 99-105.
3. Baddeley, A. D. (2013). Global Tuberculosis Report. OMS. Suiza. Tomado de:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf
4. Balandro, A. F. (2003). Manual de Técnicas de Laboratorio para el Examen Baciloscópico. México, D. F. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.
5. Blancarte, G. A. (1992). Manual de técnicas y procedimientos en el laboratorio de tuberculosis. México, D. F.: Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos InDRE
6. Bermúdez, N. A. (2005). Resistencia a drogas en *M. tuberculosis*: Bases moleculares. *Revista Médica Indexada*, 1-15.
7. Caines, I. K. (2006). Plan Mundial para Detener la tuberculosis 2006-2015. Suiza: OMS. Tomado de:
http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/GPII_SPversion%20final.pdf
8. Castellanos, A. P. (2010). Manual para la aplicación y lectura de la prueba tuberculínica (PPD). Secretaría de Salud.
9. Cole, K.D. (2005) Tuberculosis and the tubercle bacillus. ASM Press. Washington, DC.
10. Díaz (2005). Dos casos de reactivación de tuberculosis pulmonar por infliximab: Problemas y propuestas de solución. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 27-37
11. Gilpin, I. J. (2013) Manual de bioseguridad en el laboratorio de Tuberculosis. OMS, Ginebra, Suiza
12. Jawetz, L. M. (2001) Microbiología médica. México. Mc Graw Hill.

13. Lora, P. R. (2014). Evaluación bacteriológica y perfil epidemiológico de tuberculosis Pulmonar en un hospital pediátrico Mexicano. Experiencia de 19 años. *Revista de Epidemiología e Controle de Infecção*. 62.
14. Lozano, C. A. (2003). Formas clínicas de tuberculosis en pediatría: Relación con vacuna BCG y PPD. *Paediatrica*, 7-13.
15. Mandell, R.G. (2010). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th edition. Churchill Livingstone. Elsevier. USA.
16. Morbidoni, I. D. (2006). Mecanismos de acción de resistencia a rifampicina e isoniacida en *M. tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. *Revista Argentina de Microbiología*, 97-109.
17. Niseli, I. N. (2002). La tuberculosis infantil y su diagnóstico en la Argentina. *Medicina*, 585-592.
18. Organización Mundial de la Salud. OMS. (2013). Definiciones y marco de trabajo para la notificación de Tuberculosis– Revisión 2013. Ginebra, Suiza.
19. Organización Mundial de la Salud. OMS. (2005). Manual de bioseguridad en el laboratorio. Tercera edición. Ginebra, Suiza.
20. Organización Panamericana de la Salud OPS. (2013). Detección oportuna de tuberculosis permitirá reducir la mortalidad en niños y niñas. Bogotá. Tomado de: www.paho.org/col/index.php?option=com_docman&task.
21. Panqueva, J. E. (2000). Tuberculosis en niños. *Curso Continuo de Actualización en Pediatría CCAP*, 62-71.
22. Quirós, A. M. (2001). Bases moleculares de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista de Diagnóstico Biológico*. 1-4
23. Rodríguez, M. G. (2012). Epidemiología de la tuberculosis pediátrica en España, 2005-2009. *Revista Española de Salud Pública*, 49-59.
24. Rossman, M. D. (1996). *Tuberculosis. Asistencia clínica y nuevos desafíos*. México: Mc Graw-Hill Interamericana.
25. Sánchez, M. P. (2008). Inmunología y terapéutica de la vacuna BCG. *Revista Alergia México*, 153-163.
26. Secretaría de Salud. (2012). Panorama Epidemiológico y Estadístico de la Mortalidad en México 2010. MÉXICO. D. F.

27. Secretaría de Salud. (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013. Para la prevención y control de la tuberculosis. Diario Oficial de la Federación (DOF).
28. Secretaría de Salud. (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2002. Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, sueros, antitoxinas e inmunoglobulinas en el humano. Diario Oficial de la Federación (DOF).
29. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos- clasificación y especificaciones de manejo. Diario Oficial de la Federación (DOF).
30. Workalemahu, S. B. (2013). Genotype diversity of Mycobacterium isolates from children in Jimma, Ethiopia. BMC Research Notes, 352-359.