



Detección de *Mycobacterium* *tuberculosis* por observación microscópica y susceptibilidad a las drogas para el diagnóstico rápido de la tuberculosis

V. Ceballos ¹.

L.E. Guillén ².

R.D. Pimentel ³.

N. Salcedo Inoa ⁴.

¹MD, MA de Neumología del Hospital Dr. Luis Eduardo Aybar.

²MD, Maestría en Administración en Salud Pública Western Michigan University, Profesor de Bioestadística y Epidemiología Clínica de la Universidad Iberoamericana. luiss_guillen@hotmail.com

³MD, Post grado en Neumología pediátrica, PHD en Salud pública e investigación en, Jefe departamento de Investigación y enseñanza del Hospital Luis E. Aybar. Docente de la Universidad Autónoma de Santo Domingo y de la Universidad Pedro Henríquez Ureña dr.pimentelrd@gmail.com

⁴Lic. En Bioanálisis, Post grado en ciencias y tecnología de alimentos, Profesora Investigadora de Unibe. Encargada de la Sección Micología del Hospital General de la Plaza de la Salud. ncsalcedo@gmail.com

RESUMEN

En esta investigación se identifica a *Mycobacterium tuberculosis* y su sensibilidad a drogas por el método de susceptibilidad directa a fármacos mediante observación microscópica comparándose con los métodos tradicionales. **Métodos:** Se analizaron 100 muestras de esputo procedentes de dos grupos de pacientes: pacientes sintomáticos respiratorios y pacientes de alto riesgo con sospecha de tuberculosis. Se realizó baciloscopía, cultivo en medio Lowenstein-Jensen, método MODS, y susceptibilidad antimicrobiana por método de las proporciones. **Resultados:** De un total de 100 muestras procesadas, 22% resultaron positivos a la baciloscopía. 22 casos fueron positivos a Lowenstein-Jensen, y 23 casos positivos a MODS. La sensibilidad utilizando MODS fue del 100% y para el cultivo en Lowenstein-Jensen fue del 100%. La especificidad de MODS fue del 100% y LJ fue del 98.7%, ($P < 0.05$). El tiempo promedio o average para obtener resultados positivos con MODS y LJ fue de 7 y 34.17 días respectivamente ($P < 0.05$). De los 22 aislamientos determinados para hallar el patrón de resistencia, la concordancia entre MODS y el método de las proporciones fue del 96% para INH y 100% para Rifampicina. Para ambos métodos resultaron 5 MDR y un caso monoresistente a isoniazida($P < 0.05$). **Conclusiones:** El método MODS demuestra ser más rápido, más sensible y más costo-efectivo que los métodos de referencia utilizados para detectar *Mycobacterium tuberculosis*.

PALABRAS CLAVE: Tuberculosis, Método MODS, concordancia y resistencia, *Mycobacterium tuberculosis*

DETECTION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY MICROSCOPIC OBSERVATION AND SUSCEPTIBILITY TO DRUGS FOR THE RAPID DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

SUMMARY

This research compares the microscopic observation of drug susceptibility tests with traditional methods for identifying *Mycobacterium Tuberculosis*. **Methods:** This study analyzed 100 sputum samples from two patient groups: one group was categorized as having been exposed to tuberculosis and the other group was categorized as having a high risk of TB. This study performed Sputum-smears, Lowenstein-Jensen cultures, as well as the MODS method, and the proportion method. **Results:** Out of 100 samples studied, 22 cases were sputum-smear positive. 22 cases were found positive to Lowenstein-Jensen, and 23 positive cases were found to MODS. Both sensitivity and specificity for MODS were 100% ($P < 0.05$). Lowenstein-Jensen had a sensitivity of 100% and a specificity of 98.7% ($P < 0.05$). The average time for positive results using MODS was 7.04 days, while LJ took 34.18 days ($P < 0.05$). Of the 22 Sputum samples taken in order to determine the pattern of resistance, MODS and the proportion method matched in 96% for INH and 100% for Rifampin. For both methods, there were 5 MDR and one case resistant to Isoniazide ($P < 0.05$). **Conclusions:** The MODS liquid method proved to be faster, more sensitive, and more cost effective compared to the

reference methods used to detect *Mycobacterium Tuberculosis*.

KEY WORDS: Tuberculosis, MODS method, concordance and resistance, *Micobacterium tuberculosis*

DETECCIÓN DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* POR OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA Y SUSCEPTIBILIDAD A LAS DROGAS PARA EL DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE LA TUBERCULOSIS

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad respiratoria que está cobrando cada vez más importancia después del ⁽¹⁾ inicio de la epidemia por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); causando esto una alta incidencia de la coinfección Tuberculosis TB/VIH.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) ⁽¹⁾ en 2010, un total de 8,8 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,4 millones murieron por esta causa. Más del 95 por ciento de las muertes por tuberculosis ocurrieron en países de ingresos bajos y medianos, siendo esta enfermedad una de las tres causas principales de muerte en las mujeres entre los 15 y los 44 años, con un 13 por ciento de los casos presentándose como coinfección TB/VIH. La OMS ⁽²⁾ reporta que la TB es la segunda causa mundial de mortalidad por agente infeccioso.

La OMS ⁽²⁾ está enfocada en reducir el aumento de la TB para el año 2015. Su estrategia para lograrlo se basa en la DOTS (*Direct Observation of Therapy Short Course*), terapia directamente observada de corta duración. El proyecto de la estrategia DOTS asegura el entrenamiento a personal de salud para el adecuado diagnóstico y tratamiento apoyados en la microscopía de esputo, disponibilidad de fármacos para el tratamiento, apoyo de las instituciones gubernamentales y la administración supervisada de fármacos de primera línea. ⁽³⁾

Los métodos diagnósticos que se utilizan en la actualidad tiene la desventaja que se tardan un promedio de 30 días para determinar la positividad de la prueba. Hoy en día se conoce el método MODS (*microscopic-observation drug-susceptibility assay*), el cual es un método que puede mejorar la efectividad del programa para la reducción de TB por su rapidez en la detección de *Mycobacterium tuberculosis* y su sensibilidad a los fármacos. ⁽⁴⁻¹⁰⁾

En el presente estudio se basó en establecer el tiempo para detectar la *Mycobacterium tuberculosis*, así como la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba diagnóstica MODS y comparar los resultados de esta prueba con los índices de utilidad de las pruebas de detección rutinarias tales como Li[¶]wenstein-Jensen (LJ) y método de las proporciones (MP), con la finalidad de establecer diferencias significativas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio cuantitativo prospectivo con dos grupos de pacientes, se procesaron 100 muestras consecutivas de esputos procedentes de pacientes sintomáticos respiratorios con sospecha clínica de Tuberculosis (TB) y otro grupo de pacientes en alto riesgo de tener TB, que acudieron al departamento de neumología del hospital Dr. Luis Eduardo Aybar en Santo Domingo. Después de la recolección, las muestras se transportan de inmediato al laboratorio para ser procesadas. Se tomó como criterio de presencia de la enfermedad un resultado positivo con el método LJ, el cual es considerado como el "Gold standard". El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Investigación (CIE) de la Universidad Iberoamericana (UNIBE) y del comité de ética del centro de Gastroenterología del Hospital donde se realizó el estudio.

Los análisis se realizaron en el laboratorio de Tuberculosis del Centro de Gastroenterología, perteneciente al programa Nacional de la TB. El centro está en la ciudad sanitaria Dr. Luis Eduardo Aybar, el cual pertenece al área IV de la región metropolitana. Localizado en la zona suroeste del Distrito Nacional República dominicana.

La población del estudio comprende todos los pacientes que acudieron al servicio de neumología del hospital Dr. Luis Eduardo Aybar en Santo Domingo por presunta TB durante el período Enero- Junio de 2012. La muestra fue dividida en dos grupos. El primer grupo estuvo compuesto por pacientes de consulta externa, que acudan por una presunta tuberculosis al programa Nacional de control de la tuberculosis (PNCT). El segundo grupo lo formaron pacientes que acudieron al mismo departamento, por presunta TB los cuales habían estado en contacto con un paciente con TB con uno o más síntomas (fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna, hemoptisis) o un factor de riesgo como es el contacto con un paciente tuberculoso, trabajador profesional de la salud o empleado en una cárcel, hospitalización durante el año anterior o excarcelado. Ambos fueron sometidos a los mismos métodos con el objetivo de realizar el cultivo con el método MODS y Lowenstein-Jensen. Los criterios de exclusión para los dos grupos estaban basados en tener edad menor de 18 años o incapacidad o falta de disposición para otorgar el consentimiento informado por escrito. Estudiamos en [el Distrito Nacional] de la Ciudad de Santo Domingo a los pacientes que aceptaron que a sus muestras se le realizará el estudio, enviaron una muestra o dos de ser necesario, al programa de control de TB para análisis de rutina: baciloscopía con la tinción de auramina, cultivo en medio Lowenstein-Jensen y sensibilidad por el método de las proporciones, además de un cultivo en medio líquido por el método MODS.

Métodos de laboratorio:

Prueba de baciloscopía

Las muestras de esputo fueron sometidas a la coloración de auramina O y rodamina. Un técnico diferente al que trabajo con MODS realizaba los extendidos los cuales eran dejados hasta secar y fijar dentro de la misma cabina, otro técnico realizó las lecturas en el microscopio de inmunofluorescencia en cuarto oscuro el mismo día del proceso en horas vespertinas y los resultados registrados en los libros de registro del laboratorio de baciloscopía de TB para

pacientes que enviaron muestras por primera vez o no tratados.

Descontaminación de las muestras de esputo

A 2 ml de esputo se le añadió igual volumen de la mezcla de hidróxido de Sodio-N-acetil-L-acetyl cisteína-Citrato de Sodio (NaOH-NALC) como se muestra en la Fig. 1.

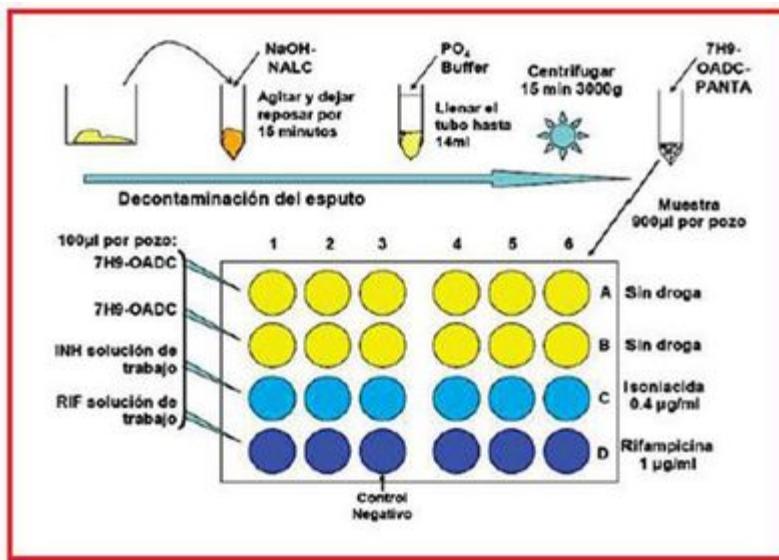


Figura: 1. Decontaminación del esputo y placa de trabajo para el estudio MODS

Fuente: Guía de MODS v 12.1 14082008

La mezcla fué agitada hasta lograr su homogenización y después se dejó reposar entre 15-20 minutos, después se neutralizó con solución tampón de fosfato (pH 6,8), hasta un volumen de 14 ml. Después se centrifugó por 15 minutos a 3.000 xg, el sobrenadante se decantó y el sedimento se resuspendió en 2 ml de caldo 7H9 con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD). De esta suspensión se retiró 1 ml en tubos estériles de microcentrífuga para ser conservado de 2-8° C como backup de seguridad, el otro ml se utilizó para ser añadido a los tubos con 7H9-OADC-PANTA destinados para las muestras. Paralelamente se utilizó una alícuota de 200 ul para ser inoculado en el medio inclinado de LJ (Difco), e incubado a 37 ° C.

Medio líquido Middlebrook 7H9 :

El caldo Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson), se preparó usando el medio base Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI), 0,31% de glicerol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 0,125% de Bacto casitona se mezclaron los componentes con agitación constante hasta su completa disolución y se esterilizó por autoclavado a 121-124° C por 15 minutos. Se dejó enfriar y se incubó a 37° C para su control de esterilidad por 48 horas. (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD). Luego se tomaron alícuotas de 4.5ml del medio en tubos de vidrio estériles, preparados para las muestras y tubos con 10.8ml para la preparación de las soluciones de antibióticos y para los controles internos. Finalmente se Incubaron a 37° C por 48 horas los tubos para verificar la esterilidad (ausencia de turbidez). Se almacenó el frasco y los tubos a 2-8° C por el período de un mes.

Soluciones estándar de antibióticos:

Con una micropipeta se prepararon las soluciones de trabajo para ambos antibióticos diez veces concentrados: (4 µg/ml de INH y 10 µg/ml RIF). Se añadieron 100 µl en los pozos correspondientes de la placa de 24 pozos para dar concentraciones finales de críticas 0,4 (µg/ml) para la INH y 1 (µg/ml) de RIF.

Preparación de las placas para el Método MODS:

El método MODS se realizó de manera segura en una cabina de Bioseguridad. Para la preparación final de la placa de MODS (ver fig. 1). A un tubo con 4,5 mL de muestra resuspendida, se añadió 0,5 mL de OADC y 0,1 mL de suplemento antimicrobiano PANTA. Luego se dispensó 900 µL de la mezcla a 4 pocillos de una columna de una placa de 24 pozos a la que previamente se añadió 100 µL de cada antimicrobiano 10x, (Un pozo para INH y otro para RIF) y 100 µL de 7H9-OADC 10% a los otros 2 pocillos señalados para el control de crecimiento Una vez inoculadas todas las muestras con sus controles internos positivos y negativos, las placas fueron selladas en bolsas con cierre Ziploc e incubadas a 37° C hasta su lectura a partir del día 5 de incubación.

Preparación de las cepas control positivo:

Por cada lote de muestras procesadas se utilizaron dos cepas de referencia como controles positivos, una sensible a INH y RIF H37Rv (ATCC 27294) y otra MDR empleando el procedimiento descrito en el Anexo 6. Del manual de Guía para el Usuario MODS.⁽¹¹⁾

Detección de crecimiento y lecturas de las placas en MODS:

Los cultivos se observaron al microscopio óptico de luz invertida (dentro de las bolsas), con el objetivo 10Xy luego con un aumento de 4x interdiario, sin incluir días feriados hasta el día 15, y luego dos veces por semana hasta el día 21 si las muestras eran de pacientes sin tratamiento y hasta el día 40 si eran de pacientes con tratamiento antituberculoso, según el método.⁽¹¹⁾ Los cultivos positivos fueron identificados por la formación de los cordones característicos de crecimiento del M. Tuberculosis (Fig. 2), en medio líquido en los pocillos de detección control sin fármaco.

Un resultado positivo para las muestra clínicas procesadas por MODS, se consideró cuando se visualizaba el crecimiento de dos o más unidades formadoras de colonia (≥ 2 UFC) en cada uno de los pozos sin droga. Un resultado negativo fue definido como la ausencia de crecimiento de unidades formadoras de colonias para el día 21 según lo describe la guía para MODS. (11) Las muestras contaminadas con bacterias u hongos, se re-decontaminaron y reprocesaron a partir de las alícuotas almacenadas.

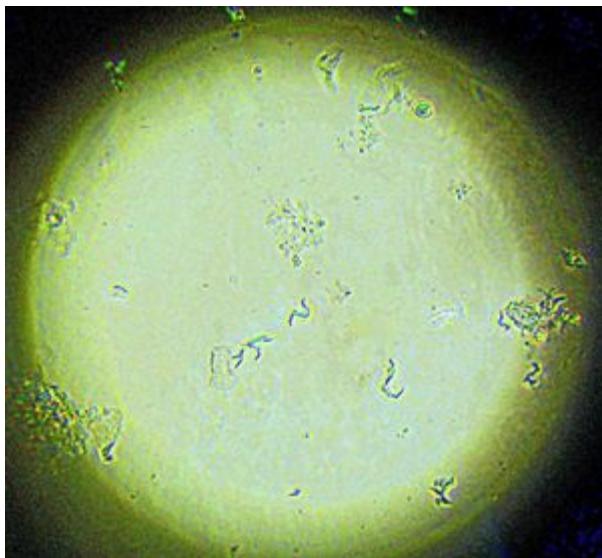


Fig. 2: formación de cordones en el medio Líquido MODS

El crecimiento en el medio de Lowenstein-Jensen (LJ):

Los cultivos se incubaron a 37°C y fueron examinados de la semana 2 hasta la semana 8, para visualizar la morfología y la pigmentación; (Fig. 3). Si no había crecimiento en 8 semanas o si la contaminación estaba presente, los cultivos fueron descartados previo autoclavado en el laboratoriocumpliendo con las normas de bioseguridad. Los cultivos procedentes de muestras BK positivos fueron incubados dos semanas más. Todos los cultivos positivos se mantuvieron 2-8°C, hasta realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de proporciones. Si había un resultado, diferente entre los dos métodos (MODS y LJ), se cultivaba la muestra a partir de la alícuota original guardada a temperatura de 2-8°C.



Fig. 3: Crecimiento de MTB en Lowenstein Jensen

*Identificación de *Mycobacterium tuberculosis**

La técnica Standard Diagnostics SD (Fig., 4), TB MPTG Rapid fue utilizada para tipificarlos aislamientos en LJ



Fig. 4. Método (SD) Standard Diagnostic INC. Para la identificación de MTB. Nótese la prueba positiva para el control Izquierdo C y el paciente T.

Prueba de susceptibilidad directa MODS:

Se definió la resistencia como el crecimiento bacteriano de ≥ 2 UFC en los pozos con drogas el mismo día en que ambos pozos sin drogas son positivos. Si se presentaba crecimiento de 1 UFC el resultado era considerado indeterminado. Se estableció una muestra como sensible como la ausencia de UFC en los pocillos donde estaban las drogas, tal como lo describe el método MODS.

Si el crecimiento resultaba ≥ 2 UFC en uno solo de los pozos con antibióticos, ya sea el de Isoniazida o Rifampicina, definiéndose como monoresistente para ese determinado fármaco. Si el crecimiento era ≥ 2 UFC en ambos pozos con drogas, se definió como MDR.

Prueba de susceptibilidad por el Método de las Proporciones:

Se realizaron las pruebas de susceptibilidad indirectas mediante el método de las proporciones para los aislados de los cultivos en Lowenstein-Jensen. Todos los procedimientos fueron realizados por dos miembros del personal del laboratorio de micobacteriología de un laboratorio externo de referencia, que desconocían los resultados de las otras pruebas. Los resultados por el método de las proporciones se obtuvieron en un promedio de 70 días, considerándose como día 1 el día desde el proceso inicial de la toma de la muestra clínica. Todos los datos fueron introducidos y analizados utilizando el software estadístico SPSS ® (*Statistical Package for the Social Science*) versión 20 para Macintosh ®. Se utilizaron estadísticos descriptivos para analizar los datos tales como el promedio de la edad de los sujetos, además del uso de las tablas 2 por 2 o tablas de contingencia las cuales fueron útiles para el cálculo de las estadísticas de las pruebas diagnósticas tales como la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN), así como

también finalmente la prevalencia y la eficacia de las pruebas diagnósticas de tuberculosis. Se utilizó la prueba estadística de "Los Signos de Wilcoxon" para establecer la diferencia estadística significativa entre las medianas de los días entre el cultivo MODS y el Lowenstein-Jensen. Para establecer asociación estadística entre las variables nominales tales como el sexo y el nivel de contacto con la enfermedad se utilizó la prueba de Chi Cuadrado de Pearson.

RESULTADOS

Las características de las pruebas diagnósticas están representadas en las tablas 1.1.1 y 2 de acuerdo con la muestra estudiada. Estas contienen los resultados de la efectividad de las pruebas diagnósticas Lowenstein-Jensen y MODS. Los datos expresados son sensibilidad, especificidad y valores predictivos; además de la prevalencia de la enfermedad para la detección de tuberculosis.

Sensibilidad y Especificidad de las Pruebas:

De los 100 casos incluidos en el estudio 22 resultaron positivos en la prueba directa de baciloscopía (BAAR). De los 100 casos, 84 fueron categorizados como "contacto sospechoso" y 16 fueron categorizados como "contacto de alto riesgo". De los 84 pacientes con presunta tuberculosis, 16 (19%) resultaron positivos al cultivo Lowenstein-Jensen y 17 (20%) casos al medio de cultivo MODS. (Ver fig. 5). Una muestra con baciloscopía negativa tuvo poco crecimiento en el medio Lowenstein-Jensen y además estuvo negativo a MODS en repetidas ocasiones, por lo que se consideró falso-positivo debido a contaminación cruzada. Otro aislamiento o caso con baciloscopía negativa fue positivo a MODS y a Lowenstein-Jensen. Del grupo de los 16 pacientes clasificada como "contacto de alto riesgo" para tuberculosis, 6 (37.5%) tuvieron cultivos positivos a MODS y a Lowenstein-Jensen y 10 (62.5%) resultaron negativos a ambos métodos. El método MODS reportó tener una sensibilidad o capacidad diagnóstica para la tuberculosis de un 100% (IC del 95%; de 82.1-100%, P < 0.05). La especificidad de este método fue de un 100% (IC del 95%; de 94%-100%, P < 0.05). Su eficacia promedio es de 99% (Tabla 1 y 1.1). La prevalencia de la enfermedad fue de un 22%.

Tiempo Promedio de Positividad de las Pruebas:

De las muestras de esputo positivo para la baciloscopía, 22 resultaron positivos para la *Mycobacterium Tuberculosis* con el método de cultivo sólido utilizado(LJ) y 23 con el método líquido (MODS). El tiempo promedio o average de crecimiento en el medio de cultivo MODS fue de 7.04 días [IC del 95%; de 6.96 al 7.13] vs. 34.18 días para Lowenstein-Jensen [IC del 95%; de 27.98 al 40.38], P < 0.05). La mediana del crecimiento en el medio de cultivo MODS fue de 7 días (rango de 7 a 8 días) y la mediana del medio de Lowenstein-Jensen fue de 30 días (rango de 21 a 60) estableciéndose con estos datos una diferencia estadística significativa entre el tiempo de positividad de ambas pruebas.

Sensibilidad y resistencia a las drogas:

De 22 aislamientos analizados para la sensibilidad a la drogas por los métodos MODS y Método de las proporciones se obtuvieron los siguientes resultados: para la Isoniazida la sensibilidad fue de un 74% para ambos el MODS y el método de las proporciones y la resistencia, por lo tanto, fue de 26% para ambos métodos. Por otro lado, para la Rifampicina la sensibilidad fue de 22%. Un aislamiento (4%) resultó MODS resistente y LJ (MP) sensible. Concordancia 96% para la Isoniazida y 100% para la Rifampicina. Para ambos métodos resultaron 5 MDR, un caso monoresistente a la Isoniazida y sensible a la Rifampicina ($P < 0.05$).

Tabla 1. Características de los resultados para los métodos diagnósticos MODS y Lowenstein-Jensen (tabla 2 por 2):

Resultados de la prueba Diagnóstica	Enfermedad:			
	Presente	Ausente	Totales:	
Positiva	22	1	23	
Negativa	0	77	77	
Totales:	22	78	100	
Resultados de la prueba Diagnóstica MODS				
Positiva	23	0	23	
Negativa	0	77	77	
Totales:	23	77	100	

Se consideraron positivos los que fueron positivos con cualquiera de los dos métodos. Los cultivos negativos eran los que resultaron negativos a ambos métodos ($P < 0.05$). De los 22 casos en los cuales la enfermedad estaba presente el método MODS dio positivo en todos esos casos, sensibilidad = 100%. Con respecto a los 78 casos donde la enfermedad estaba ausente el método MODS dio negativo en 77 de ellos, especificidad = 100%

Tabla 1.1. Índices de positividad del método diagnóstico MODS en relación al crecimiento en los medios (eficacia = 99%).

índices de la prueba de MODS	Valor estimado (%)	Intervalo de Confianza	
		Límite inferior (%)	Límite superior (%)
*Sensibilidad	100.0	81.5	100.0
Valor predictivo positivo	100.0	82.2	100.0
Valor predictivo negativo	100.0	94.0	100.0
Falsos-positivos	0.0	0.0	17.8
Falsos-negativos	0.0	0.0	5.9
Prevalencia de TB	22.0	15.4	32.6
*(P < 0.05)			

Tabla 2. Tiempo promedio o average en días de positividad de los resultados:

	Estadística descriptiva del crecimiento en el cultivo en días.					
	N	Mínima (en días)	Máxima (en días)	Media	Desviación estándar	Mediana
Crecimiento en L-J	22	21	60	34.18 días	14.82 días	*30 días
Crecimiento en MODS	23	7	8	7.04 días	0.20 días	*7 días

Se estableció diferencia estadística significativa entre el tiempo de positividad de las pruebas utilizando el estadístico de Los Signos de Wilcoxon(P < 0.05)

La edad promedio o average de los pacientes fue de 41.9 años (mínima de 18 años y máxima de 98 años), con una desviación estándar de 18.6 años

Tabla 3. Sexo de la muestra y su relación con el tipo de contacto con pacientes con tuberculosis

		Tipo de contacto con tuberculosis		Total	
		Sospechas de TB	Sospecha de alto riesgo		
Sexo de la muestra	Masculino	N	49	9	58
	Femenino	N	35	7	42
Total			84	16	100

*Chi Cuadrado de Pearson (χ^2) = 0.877; ($P > 0.05$). No se encontró relación entre el sexo de los pacientes y el nivel de exposición a la enfermedad ($P > 0.05$)

Tabla 4. Comparación de los resultados de sensibilidad a antibióticos Isoniazida y Rifampicina de los aislados para la *M. tuberculosis* determinados por MODS, Lowenstein-Jensen (MP) y concordancia con el método de referencia.

Resultados de sensibilidad	Drogas	
	Isoniazida (INH)	Rifampicina (RPM)
Sensible a ambos métodos: MODS y L-J (MP)	17(74%)	17(74%)
Resistentes a ambos métodos: MODS y L-J (MP)	6(26%)	5(22%)
MODS resistente y L-J (MP)* sensible	1(4%)	0

Concordancia	96%	100%
Discordancia	4%	0%
**Kappa	0.88	1.0
Total de aislados analizados (n)	23(100%)	22(100%)

Lowenstein-Jensen(MP): método de las Proporciones. *5 MDR a ambos métodos, un caso monoresistente a la Isoniazida y sensible a la Rifampicina ($P < 0.05$). **El estadístico Kappa describe la fortaleza del acuerdo entre MODS y el método de referencia más allá de la ocurrida por azar.

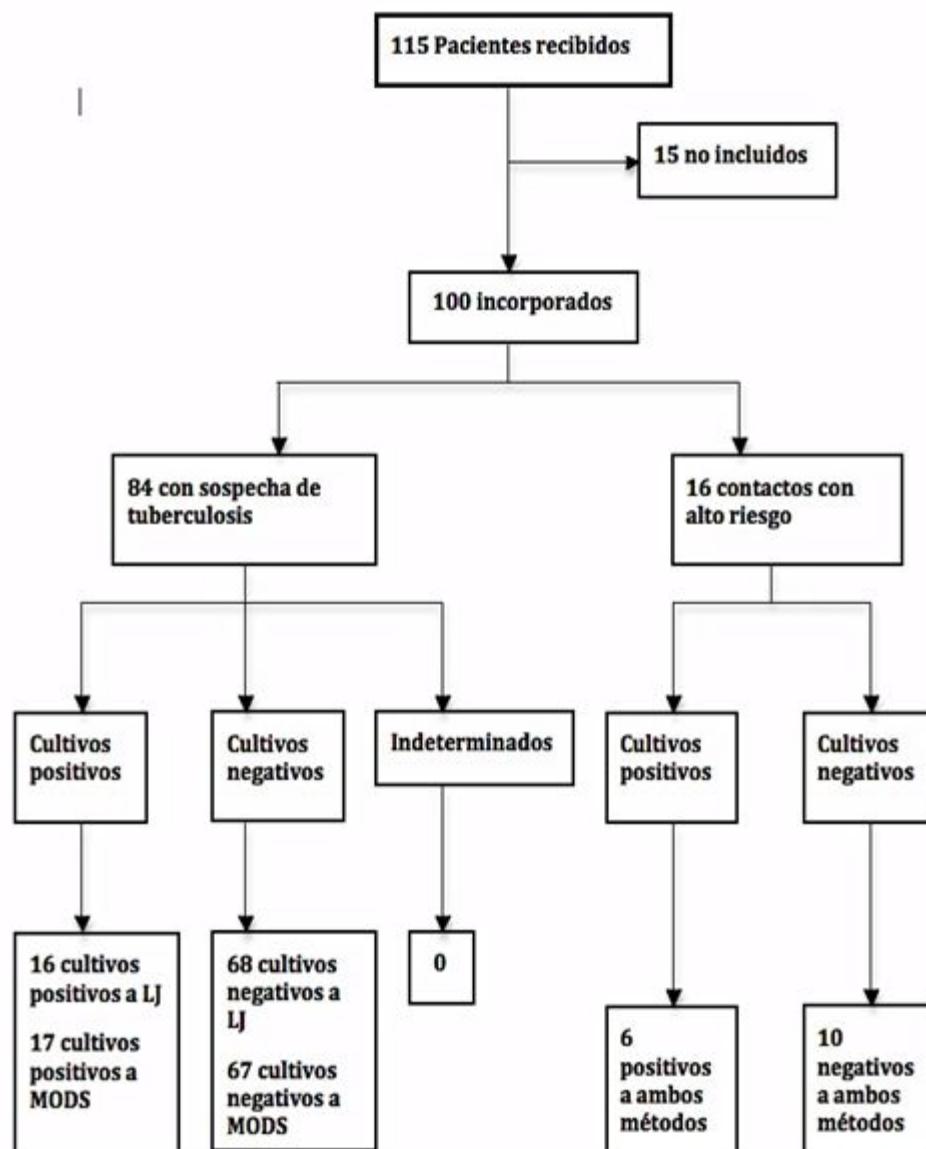


Figura 5. Grupos de Pacientes del estudio, resultados de los cultivos en Lowenstein-Jensen (LJ) y los cultivos en medio liquido (MODS). De los 115 pacientes que enviaron sus esputos, 15 muestras fueron excluidas: 3 por edad menor de 18 años, 8 por no haber firmado el consentimiento informado y 4 por ser recibidas en envases inapropiados, mal tapados o con poca cantidad de muestra. Se consideraron positivos los que fueron positivos con cualquiera de los dos métodos. Los cultivos negativos eran los que resultaron negativos a cualquiera de los métodos o a ambos. Para los pacientes con presunta tuberculosis, las 84 muestra resultaron 16 positivos al cultivo de LJ, y 17 a MODS. Una muestra con baciloscopía negativa tuvo poco crecimiento en LJ, negativo a MODS en repetidas ocasiones, por lo que se consideró falso positivo debido a contaminación cruzada. Otro aislamiento con baciloscopía negativa fue positivo a MODS y LJ. Del grupo de pacientes con alto riego de TB, 6 de 16, tuvieron cultivos positivos a MODS y LJ y 10 resultaron negativos a ambos métodos.

*Pacientes con sospecha: sospecha clínica de presunta tuberculosis

** pacientes de alto riego: con presunta tuberculosis los cuales habían estado en contacto con un paciente con tuberculosis, con uno o más síntomas (fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna, hemoptisis) o un factor de riesgo como es el contacto con un paciente tuberculoso, trabajador profesional de la salud o empleado en una cárcel, hospitalización durante el año anterior o excarcelado.

DISCUSIÓN

>El presente estudio amplía y proporciona apoyo a los resultados obtenidos en otros entornos^(4-10,12) demostrando que la prueba MODS para detección de TB-MDR supera el método de referencia estándar Lí~~I~~owenstein-Jensen que se utiliza en los países en desarrollo para detectar TB especialmente en países con alta endemia por lo que su uso y futura acreditación deben de ser implementados en nuestro sistema de salud.

Se evaluaron muestras de esputos de manera consecutiva y recibidos en el laboratorio a partir de pacientes con sospechas de TB pulmonar y otro grupo considerado con factores de alto riesgo. Los frotis de esputo positivo (entre 1-3 cruces, n = 22) fueron establecidos debido a su visualización con el método auramina o rodamina, en el microscopio de fluorescencia.

Los resultados del presente estudio, demuestran que el método MODS cuenta con una sensibilidad y especificidad excelente, las cuales lograron alcanzar índices del 100%. Esto nos indica que la prueba identifica la enfermedad en un 100% y discrimina a las personas sin la enfermedad también en un 100% de las ocasiones. En un estudio con MODS realizado por Lazarus, et al⁽¹²⁾, aseguran que MODS tiene una sensibilidad de 94.12% y una especificidad de 89.39%. Al poner en práctica el ensayo MODS para pacientes con baciloscopia positiva y pacientes MDR, Eligü, et al⁽¹³⁾ encontraron que la sensibilidad y especificidad de MODS fueron muy cercanas a la obtenida en el presente estudio (sensibilidad 95% y especificidad 100%). En un estudio de acreditación del método MODS en Perú se reportó una menor sensibilidad⁽¹⁴⁾. Así como los reportados por Maxine, et al⁽¹⁵⁾. Además Bowanga, et al⁽¹⁶⁾, encontraron una sensibilidad de 95% y especificidad de 100% para MODS al ser comparado

con los métodos de Nitrato Reductasa y otros dos test comerciales Genotípicos.

Como prueba de diagnóstico de TB y TB-MDR, el ensayo MODS fue más rápido para identificar TB y determinar el patrón de resistencia a los fármacos Isoniacida y Rifampicina que el método de susceptibilidad convencional de las proporciones. Al ser MODS un método de cultivo en medio líquido tuvo un crecimiento mucho más rápido que el método tradicional en medio sólido Lowenstein-Jensen. La mediana de tiempo para detectar crecimiento de *M. tuberculosis* en el presente estudio con MODS y LJ fue de 7 y 30 días respectivamente, lo que confirma lo previamente establecido. Esto permite un diagnóstico precoz de la enfermedad y el tratamiento adecuado con disminución de la transmisión. Minion, et al⁽¹⁷⁾, encontraron un promedio de positividad de 9 días en la prueba MODS frente al método Lowenstein-Jensen, esto expresa la rapidez ventajosa de MODS sobre los demás métodos diagnósticos. Cabe destacar que los retrasos en el diagnóstico de TB es una de las causas fundamentales del aumento en la mortalidad de dicha patología. Esta detección temprana de la enfermedad con MODS especialmente la TB-MDR reduciría significativamente la letalidad producida por esta enfermedad.

En el estudio se determinó el patrón de resistencia a Isoniazida y Rifampicina la cual fue del 100% para Isoniazida y 96% para Rifampicina. Los cultivos líquidos son más rápidos con disponibilidad simultánea de los resultados de sensibilidad a los medicamentos que los cultivos sólidos, pueden potencialmente ayudar en la eliminación de la TB activa y facilitan el uso de medicamentos preventivos⁽¹⁷⁾.

Un aislamiento procedente de una muestra que era baciloscopía negativa tuvo poco crecimiento en Lowenstein Jensen, y fue considerado negativo a MODS en dos ocasiones repetidas por lo que se consideró como falso-positivo debido a contaminación cruzada. El presente estudio demuestra que MODS tiene una tasa de ocurrencia de falsos-positivos y falsos-negativos igual a cero. Moore, et al⁽¹⁸⁾ encontraron que la contaminación cruzada entre MODS, Lowenstein Jensen y MB bactT fueron igualmente bajos, con índices de 0.3 a 3.3%, lo cual permitiría el uso de medios líquidos altamente enriquecidos como el MODS para su implementación en los laboratorios que quieran adoptarlo, cuyos resultados son comparables a lo encontrado en nuestro trabajo.

En estudios realizado por diferentes autores, (19,20) indica que el costo de MODS está entre \$US 0.77 a \$US 2.00) a diferencia de otros métodos más costosos para identificación y sensibilidad de *M. tuberculosis* en países de escasos recursos. En el presente estudio el valor promedio de este parámetro, sin incluir el microscopio de US\$ 2,000.00 fue de 2.64 dólares estadounidenses por prueba. El método sólido convencional cuesta alrededor de 18.00 dólares estadounidenses por prueba, que al ser comparado con el MODS se distingue una diferencia marcada.

Con toda la evidencia generada a partir del presente estudio podemos confirmar nuestra hipótesis de investigación que plantea que el cultivo en medio líquido MODS es más rápido, sumamente sensible, efectivo y sobretodo más económico que el medio sólido tradicional de Lowenstein-Jensen. Esto permite un diagnóstico temprano de la TB, además de determinar la sensibilidad a las drogas, lo que contribuye a un mejor manejo y control de la patología.

Cabe destacar que el MODS ha sido reconocido como un método válido para el diagnóstico de TB por la Organización Mundial de la Salud.⁽²¹⁾ De manera que estamos frente a una gran herramienta en la lucha contra la TB en el mundo y en nuestro medio. Su alta sensibilidad de un 100% identifica su capacidad para detectar la enfermedad; y su especificidad (de también un 100%) determina su capacidad de identificar personas sanos con una eficacia promedio es de 99%. Con este primer ensayo de MODS en República Dominicana, nos encontramos en proceso de crear conciencia para que el método MODS sea un método ampliamente utilizado en aras de mejorar la capacidad diagnóstica de una enfermedad infecciosa crónica y endémica que representa un problema de salud en nuestro país.

MODS es un método que fue desarrollado en Perú y esta implementado dentro de su programa estatal de lucha contra la TB, su utilización de manera extensa debe ser una prioridad trascendental para los sistemas de salud pública en otros lugares que cuentan con una alta prevalencia e incidencia endémica de TB y sobre todo ante el incremento de la resistencia a las drogas de primera línea⁽²²⁾ en República Dominicana.

Conclusiones:

-Este estudio es la primera evaluación del método MODS en República Dominicana; país que cuenta con una elevada endemia de la tuberculosis pulmonar.

-En los dos grupos del estudio, el ensayo MODS detectó la *M. tuberculosis* en el esputo con mayor sensibilidad y rapidez e identificó las cepas multidrogo resistentes en menos tiempo que los cultivos de Lowenstein-Jensen y proporciones respectivamente, con una elevada concordancia en los resultados de la susceptibilidad tanto para los monoresistentes como para los TB-MDR

-Nuestros resultados demuestran que el ensayo MODS puede ser considerado para usarse en lugares donde existe una endemia de TB debido a su costo-efectividad y que métodos rápidos deben de ponerse en práctica para la temprana identificación de los casos. Esto se traduce entonces en un mejor pronóstico y una reducción de la prevalencia de la patología.

Como nuestro trabajo se llevó a cabo en un grupo reducido de pacientes con sospecha de la enfermedad y en otro grupo que había estado en contacto con pacientes infectados, estudios futuros más amplios son necesarios.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el "Financiamiento del Fondo de Investigación Competitiva de UNIBE 2011", Decanato de Investigación, además con el apoyo de infraestructura, equipos y materiales del laboratorio de Gastroenterología del Hospital Luis Eduardo Aybar, sección de Tuberculosis. Los autores reconocen que no presenta conflictos de intereses ni económicos ni competitivos.

Los autores quieren agradecer: A la Dra. Jennifer García, a los monitores de esta investigación: Gabriel Smester, Ana Carla Suarez y Ramiro Matos por su incansable colaboración. a la Dra. Belkis, Dra. Mirna Font Frías, Lic. Ramona Fulcar y Elia Cáceres y a la Dra. Violeta González por el soporte institucional. Al personal del laboratorio de Microbiología, Lcidas: Carmen Herasme y Josefina Lantigua por el procedimiento de los métodos tradicionales. A la Dra. Iris Padilla por

la colaboración con el método de las Proporciones. Al personal Médico del departamento de Neumología del Hospital Luis E. Aybar por su cooperación en la selección de pacientes. Al personal del departamento de Infectología: Por su ayuda con el reclutamiento de los sujetos de estudio y el seguimiento al consentimiento informado. A Giannina Luna Colombo por la ejecución del Plan Piloto en República Dominicana. A Ginia Montes de Oca, por la corrección del manuscrito de la propuesta.

Las contribuciones específicas de los autores son las siguientes: Diseño del estudio Noris Salcedo Inoa y Dr. Rubén Darío Pimentel; elaboración del estudio, recopilación y análisis de datos: Noris Salcedo Inoa. Análisis de los datos estadísticos e interpretación de los mismos; Dr. Guillén LE y Dr. Luis Eduardo Garrido. Revisión del manuscrito final todos los autores. Un agradecimiento especial a Jorge Coronel por sus sugerencias al documento final. Los autores quieren expresar un especial agradecimiento al Dr. David Moore por su apoyo incondicional en el desarrollo del trabajo, así como a la Dra. Luz Caviedes (ida a destiempo).

REFERENCIAS

1. World Health Organization. Global tuberculosis control [en linea]. 2011. [agosto,2012]. Disponible en: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/erte2011s/index.htm
2. World health organization. Anti-tuberculosis Drug Resistance en the world. Fourth global report. Geneva, Switzerland: WHO;2004. WHO/HTM/TB 2008.394
3. Santos-Preciado JI, Franco-Paredes C.Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES o DOTS) para tuberculosis en poblaciones con niveles moderados de farmacorresistencia. Rev. invest.clín. [en linea] 2005 may-jun [acceso jul 2012];57 (3).Disponible en: www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0034...script=sci_arttext
4. Moore DAJ, CAW Evans, RH Gilman, Caviedes L, Coronel J, Vivar A, et al. Ensayo de sensibilidad a fármacos mediante observación microscópica para el diagnóstico de la TB.N Engl J Med. 2006; 12 oct;355(15):1539-1550.
5. Shiferaw G,[Woldeamanuel Y](#),[Gebeyehu M](#),[Girmachew F](#),[Demessie D](#),[Lema E](#). Evaluación de Ensayo de susceptibilidad de drogas microscópica de observación para la detección de la tuberculosis resistente aMycobacterium tuberculosis.J Clin Microbiol, 2007;45(4): 1093-1097.
6. Caviedes L, Tien-Shun L,Gilman R H, Sheen P, Spelman E, Lee EH, et al. Rapid, Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosisin Sputum by Microscopic Observation of Broth Cultures. J Clin Microbiol. 2000; 38 (3): 1203-1208.
7. Moore D, Mendoza D, Gilman RH, Evans Carlton AW, Hollm Delgado MG, Guerra J, et al. Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay, a Rapid, Reliable Diagnostic Test for Multidrug-Resistant Tuberculosis Suitable for Use in Resource-Poor Settings .J Clin Microbiol. 2004; Vol. 42(10): 4432"“4437.
8. Oberhelman RA, Soto-Castellares G, Caviedes L, Castillo ME, Kissinger P, Moore DAJ, et al

Gilman R. Improved Recovery of *Mycobacterium tuberculosis* from Children using the Microscopic Observation Drug Susceptibility (MODS) Method. *Pediatrics* [en linea] 2006 Jun 2 [accesado dic 2011]; 118 (1):100-106]. Disponible en: <http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/118/1/e100>

9. Mello FC, Arias MS, Rosales S, Marsico AG, Pavón A, Alvarado Gálvez C, et al. Clinical Evaluation of the Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Resistance to Isoniazid or Rifampin. *J Clin Microbiol* [en linea] 2007 [accesado 15 agosto 2007];45 (10): [3387“3389]. Disponible en: www.jcm.asm.org/cgi/content/short/45/10/3387

10. Shah NS, Moodley P, Barbaria P, Salona Moodley MR, Richardson J, Scott H, et al. Diagnosis of Tuberculosis and MDR TB Using the Microscopic-Observation Drug-Susceptibility (MODS) Assay in a High HIV Prevalence Setting "South Africa. *Am J Respir Crit Care Med* [en linea] 2011[accesado 4 feb 2011]; 183:1427-1433. Disponible en: <http://ajrccm.atsjournals.org/content/183/10/1427.full?sid=2f5bad19-d714-4a60-a534-53f09fff687f>

11. Caviedes L, Coronel J, Evans C, Gilman B, Moore D. Microscopic observation drug susceptibility assay MODS, Guía del usuario. Lima-Perú. 2008. Disponible en: www.nejm.org

12. Lazarus RP, Kalaiselvan S,KR John,JS Michael. Evaluation of the microscopic observational drug susceptibility assay for rapid and efficient diagnosis of multi-drug resistant tuberculosis [en linea] 2012. Disponible en: www.ijmm.org/text/asp?2012/30/1/64/93039

13. Ejigu GS,Woldeamanuel Y,Shah NS,Gebyehu M,Selassie A,Lemma E. Microscopic-observation drug susceptibility assay provides rapid and reliable identification of MDR-TB. *Int J Tuber Lung Dis*.2008 Mar; 12(3):332-7.

14. J. Coronel, Roper M, Mitchell S, Castillo E, Gamarra N, Drobniowski F et al. MODS accreditation process for regional reference laboratories in Peru: validation. MTBDRplus [en linea] 2010 [accesado 23 may 2012]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20937190>

15. Maxine -Caws, Thi Minh D, Torok E, Campell J, Anh Thu DD, Hong Chau TT et al. Evaluation of the MODS Culture Technique for the Diagnosis of Tuberculous Meningitis. PLOS ONE(2007) ;2 (11).Disponible en: www.plosone.org/.../info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.000117

16. Bwanga F,Hoffner S,Haile M,Joloba ML. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: a meta-analysis. *BMC Infect Dis* [en linea] 2009 May [accesado 4 jun 2011] 20; 9-67.Disponible en:www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19457256

17. Minion J, Pai M. Expanding the Role of the Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay in Tuberculosis and HIV Management. *Oxford Journals* [en linea] 2010 [accesado 11 nov 2011]; 50(7): [997-999]. Disponible en: cid.oxfordjournals.org/content/50/7/997.full

18. Moore DA, Caviedes L, Gilman R. Infrequent MODS TB culture cross-contamination in a high-burden resourcepoor setting. *Díagn Microbiol Infect Dís*2006; 56(1): 35-43.

19. Arnez-duran RA, Aylon-anzaldo LA, Castro Soto R, Lozano Beltran D. El Método MODS, una

Alternativa para el Diagnóstico de la Tuberculosis y la Detección de Cepas Multidrogoresistentes. Rev Cient Cienc Méd.2010; 13(2):81-85.

20. Caviedes L, moore DA,Introducing mods: A low cost-test tool for high-performance detection of tuberculosis and multidrug resistant tuberculosis. Indian J Med Microbiol. 2007; 25:87-88.

21. World Health Organization. Non-Commercial culture and drug susceptibility testing methods for screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis-Policy Statement [en linea]. July 2010; [accesado 13 oct 2011]. Disponible en: www.who.int/entity/tb/dots/laboratory/whopolicy_noncommercial_culture_and_dstmethods_july10.pdf

22. Zozio Thierry, Garcia Siragusa V, Padilla I. (2008). [Research on infectious diseases: a global challenge](http://www.pasteur.fr/infosci/conf/sb/RIIP08/.../book_RIIP_complet.pdf). Disponible en www.pasteur.fr/infosci/conf/sb/RIIP08/.../book_RIIP_complet.pdf RP evaluación