

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN –DIGI-
HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS
CLINICA FAMILIAR “LUIS ANGEL GARCÍA”**



INFORME FINAL

**DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR MICOBACTERIAS E IDENTIFICACIÓN
DE SUS FACTORES DE RIESGO EN PERSONAS VIVIENDO CON HIV/SIDA, A
TRAVÉS DE UN PROGRAMA DE ENTRENAMIENTO DOCENTE.**

Licda. Tamara Velásquez Porta
MSc. Blanca Samayoa Herrera
Dr. Eduardo Arathoon
Dalia Lau
Sergio A. Lickez

Guatemala Enero-Dic/2000

I. INTRODUCCION

La incidencia de la tuberculosis durante las primeras ocho décadas del siglo XX alcanzó súbitamente su menor nivel, a comienzos de la década de 1980 y la línea basal de cero en muchas partes del mundo, a fines de la década de 1970. Muchos microbiólogos tuvieron entonces la convicción de que la tuberculosis estaba cerca de ser vencida, de hecho sucedió lo opuesto.

Actualmente las tasas de morbilidad y mortalidad están aumentando a medida que han aparecido especies de *Mycobacterium* resistentes a múltiples drogas y en particular por la aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Se estima que 2 mil millones de personas están infectadas con *M. tuberculosis* y otras especies de *Mycobacterium* y que 3 millones de personas mueren anualmente por complicaciones de esta enfermedad en todo el mundo (1). De 8 millones de nuevos casos cada año, el 95% aparece en países en vías de desarrollo (2). En los países industrializados, el 80% de los casos se presentan en personas mayores de 50 años, mientras en los países en vías de desarrollo el 80% de los casos se produce entre las edades de 15 a 50 años.

Se estima que 3 millones de personas con tuberculosis en el mundo también están infectadas con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV) (2). Las tasas de aumento son aun mayores en los países en vías de desarrollo, debido al incremento de inmigración de personas provenientes de regiones de alta endemidad, a condiciones socioeconómicas declinantes en las regiones densamente pobladas, y a la cantidad en aumento progresivo de individuos infectados con HIV.

La tuberculosis es la principal causa de muerte en personas viviendo con HIV/SIDA en todo el mundo. Aproximadamente un tercio de todas las muertes relacionadas con SIDA son causadas por tuberculosis (3). Para el año 2000, casi el 14% de más de 8 millones de casos de tuberculosis son atribuidos a la infección de HIV, la mayoría de estos pacientes viven en Africa y el sudeste de Asia (4). En algunos países de Africa más del 50% de todas las personas con tuberculosis son HIV positivas (5). En Brasil, se ha estimado que 200,000 personas están co-infectadas con HIV y *M. tuberculosis*, especialmente en ciudades como Rio de Janeiro y Sao Paulo (6).

En Guatemala, el Programa Nacional de Prevención del SIDA ha señalado que 30% de los pacientes con SIDA desarrollará tuberculosis (7). Datos de la Asociación de Salud Integral –ASI-, estiman que aproximadamente de 20 a 35% de las personas HIV positivo que acuden a la clínica “Luis Angel García” del Hospital General San Juan de Dios, desarrollarán tuberculosis como primera infección oportunista (8-10).

Con esta investigación se pretendió implementar las técnicas necesarias de cultivo, aislamiento e identificación de especies de micobacterias a través del entrenamiento continuo de estudiantes de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia que realizaron sus prácticas docentes en el Hospital General San Juan de Dios, mejorar el diagnóstico de la tuberculosis e identificar los determinantes de riesgo en las personas con HIV/SIDA que atendió la Clínica Familiar “Luis Angel García” del referido hospital.

Los resultados alcanzados con este proyecto son: mejoramiento de la infraestructura física y de diagnóstico de las infecciones por micobacterias en un hospital nacional, la capacitación en el diagnóstico de micobacterias y HIV/SIDA, de profesionales en formación

de la Escuela de Química Biológica, registro y colección de cepas de micobacterias para futuros estudios epidemiológicos de susceptibilidad y biología molecular y los determinantes de riesgo de la infección mixta de micobacterias y HIV/SIDA.

Por último, el impacto de este estudio se reflejó en la cantidad y calidad del diagnóstico de infecciones por micobacterias, no sólo en personas viviendo con HIV/SIDA, sino también en todos los pacientes del Hospital General San Juan de Dios que así lo requirieron, de esta forma se alcanzó uno de los objetivos principales de la Universidad de San Carlos, servir a la población guatemalteca.

II. MÉTODOS Y TÉCNICAS

2.1 Metodología de capacitación docente

2.1.1 Población Blanco:

Estudiantes de Química Biológica que realizaron practicas de Experiencias Docentes con la Comunidad (EDC), en el Hospital General San Juan de Dios en el año 2,000. Estudiantes de Química Biológica que realizaron practicas de Ejercicio Profesional Supervisado (EPS) durante el segundo semestre del año 2,000.

2.1.2 Tipos de Capacitación:

Se realizaron dos tipos de capacitación de acuerdo a la población blanco que se atendió. La primera de ellas incluyó a estudiantes de EDC que recibieron una semana de capacitación con docencia directa y practica supervisada. La segunda fue dirigida a estudiantes de EPS. Es de hacer notar que para ambos grupos se elaboró un programa de actividades (Anexo No.1)

A continuación se describen las distintas actividades realizadas durante estas capacitaciones.

2.1.3 Capacitación a estudiantes de EDC:

Durante esta actividad se procedió de la siguiente manera:

- a. Entrega del programa de actividades.
- b. Clase magistral sobre generalidades y diagnóstico de micobacterias.
- c. Presentación de video (en español) sobre normas de bioseguridad y procesamiento de muestras para el diagnóstico de micobacterias. El video fue donado al proyecto de tuberculosis por la Licda. Ana Maria Xet (Universidad de Berkeley). Ambas actividades fueron seguidas de una discusión con la coordinadora y la asistente de investigación asignada al laboratorio.
- d. Presentación y guía para la utilización de manuales de toma y manejo de muestras y procedimientos microbiológicos.
- e. Preparación de materiales, reactivos y medios de cultivo.
- f. Utilización de materiales, reactivos y medios de cultivo.
- g. Procedimientos de digestión, decontaminación, preparación de frotos (BK) y cultivo de muestras para el diagnóstico de micobacterias.
- h. Observación de las baciloscopías.
- i. Informe de resultados de baciloscopías.
- j. Observación de cultivos e identificación presuntiva de colonias de micobacterias.

La evaluación para los estudiantes de EDC se llevó a cabo a través de un examen escrito (Anexo No.2), el examen se realizó al finalizar la semana de capacitación y tuvo un valor de 100 puntos. La nota alcanzada por cada estudiante formó parte de la nota final que se obtiene en la sección de Microbiología en las practicas de EDC en el Laboratorio Escuela.

2.1.4 Actividades durante el Taller de Tuberculosis:

Para este taller se realizó lo siguiente:

- a. Organización de los grupos de trabajo.
- b. Entrega del programa de actividades.
- c. Entrega de material escrito.
- d. Clase magistral sobre generalidades y diagnóstico de micobacterias.
- e. Presentación de video sobre normas de bioseguridad y procesamiento de muestras para el diagnóstico de micobacterias seguidos de discusión.
- f. Procedimientos de digestión, decontaminación, preparación de frotos (BK) y cultivo de muestras para el diagnóstico de micobacterias.
- g. Observación de las baciloscopías.
- h. Observación de cultivos.
- i. No se efectuó ninguna evaluación de los estudiantes participantes en este taller.

2.2 Servicio de diagnóstico de infección por micobacterias

2.2.1 Población servida: pacientes que acuden a la Clínica Familiar “Luis Angel García” y pacientes de los diferentes servicios del Hospital General San Juan de Dios:

2.2.2 Flujograma de servicio: las muestras clínicas obtenidas de los pacientes fueron procesadas de acuerdo al siguiente flujo de trabajo.

- a. La muestra clínica recolectada de cada paciente se trasladó al laboratorio clínico del Hospital General San Juan de Dios, sección de Microbiología.
- b. La muestra se ingresó a los registros de la sección de Microbiología.
- c. La muestra se trasladó al laboratorio de micobacterias y se registró en los libros correspondientes.
- d. Se aplicaron los procedimientos de preparación de frotos (baciloscopías), cultivo, aislamiento e identificación de colonias sospechosas de micobacterias, según se describe posteriormente.
- e. Los resultados de las baciloscopías se informaron al día siguiente de recibida la muestras y el informe de los cultivos requeridos, se liberaron, si el resultado fue negativo, 8 semanas después de recibida la muestra.
- f. Al haber crecimiento de colonias sospechosas de micobacterias se procedió a realizar los procedimientos de identificación para informar el resultado obtenido.

2.3 Diagnóstico de laboratorio para infección de micobacterias

Los procedimientos microbiológicos básicos utilizados en la presente investigación incluyeron lineamientos para garantizar la bioseguridad en el procesamiento de las distintas, métodos de colección de muestras clínicas especiales (sangre, médula ósea, biopsias, etc.), preparación de materiales y reactivos, controles de calidad, etc.

El detalle de cada uno de estos lineamientos puede ser consultado en el Anexo No 3 de este informe y en el manual de procedimientos elaborado para el proyecto (11-13).

2.4 Metodología de Entrevista Epidemiológica

El estudio propuesto consistió de observaciones prospectivas. Se eligió una muestra consecutiva de pacientes con HIV/SIDA que acudieron a la Clínica Familiar “Luis Angel García”. Todos los pacientes con diagnósticos presuntivos de tuberculosis u otras infecciones por micobacterias fueron invitados para participar en este estudio

2.4.1 Población: personas viviendo con la infección VIH/SIDA en la ciudad de Guatemala.

2.4.2 Muestra: personas viviendo con VIH/SIDA, que atienden la Clínica Familiar “Luis Angel García” del Hospital General San Juan de Dios en la ciudad de Guatemala, durante el periodo del 01/02/2000 al 30/11/2000. Personas menores de 18 años no fueron entrevistadas en este grupo de estudio. La participación en el estudio fue voluntaria y luego de obtener el consentimiento firmado de participación. (Anexo 4).

2.4.3 Lugar de estudio: Clínica Familiar “Luis Angel García” situada en el Hospital General San Juan de Dios, ciudad de Guatemala.

2.4.4 Reclutamiento de pacientes:

Los pacientes fueron asignados en orden consecutivo conforme eran evaluados en la clínica. Ingresaron todos aquellos pacientes que se les sospechó de infección por micobacterias pulmonar o diseminada. Luego de que brindaron su consentimiento en este estudio se les efectuó una evaluación clínica por parte del personal médico y una encuesta epidemiológica por un asistente de investigación.

2.4.5 Evaluación clínica:

La evaluación clínica de los pacientes se llevó a cabo como parte de la rutina de la Clínica Familiar “Luis Angel García”. Los médicos encargados evaluaron y llenaron parte de la historia clínica y decidían las evaluaciones necesarias (laboratorios, rayos X y otros procedimientos). Los médicos indicaban al auxiliar de investigación si el paciente podía ser incluido en el estudio y proceder a entrevistarlos.

2.4.6 Entrevista epidemiológica

a. Tiempo de la entrevista:

Los participantes fueron invitados a participar en una entrevista con el objetivo de cumplir con los objetivos propuestos para esta fase. Se calculó que la entrevista y los procedimientos de toma de muestras de esputo o sangre, tomaron regularmente 45 minutos.

b. Contenido de la entrevista:

Este estudio desarrolló una entrevista con las preguntas apropiadas y escalas de acuerdo a las variables estudiadas. La validación de las formas fue hecha a través de un estudio simulado. Finalmente el control de calidad de estas formas fue realizado por evaluaciones periódicas.

La estructura de los aspectos tomados en este informe es la siguiente (la entrevista completa puede ser observada en el Anexo No. 5)

- Demográficos:
- Esta sección incluyó preguntas acerca de edad, género, escolaridad, embarazo, privado de libertad, etc.
- Factores relacionados con trabajo y vivienda:
Incluyó la vivienda, estado civil, número de hijos, tipo de facilidades en la vivienda, características en el trabajo, etc.
- Factores clínicos asociados:
Cada una de las encuestas tuvo correspondencia con la historia clínica del paciente y los factores asociados a la infección VIH en sus aspectos clínicos.
- Resultados microbiológicos: En esta parte de la encuesta se colectó información acerca de los cultivos, aislamiento, identificación de las micobacterias aisladas.

c. Recolección de esputo, sangre y otras muestras clínicas:

El auxiliar de investigación que efectuó la entrevista, también recolectó las muestras de esputo y sangre de pacientes ambulatorios u hospitalizados en los casos que era posible. Otras muestras clínicas que involucraron procedimientos especiales como: biopsias, punción lumbar, toracentesis, broncoscopia, etc., fueron efectuados por el personal médico de la Clínica Familiar. Estas últimas muestras fueron también trasladadas por el auxiliar de investigación para su procesamiento en el laboratorio. Cuando se efectuaron estos procedimientos en los servicios de encamamiento del hospital, las muestras fueron recolectadas y trasladadas por el personal médico de estos servicios.

2.5 Colección, manejo y análisis estadístico de los datos recolectados

a. Colección y manejo de datos

Todos los datos resultantes de las entrevistas y resultados de laboratorio fueron transferidos a la base de datos Epi-Info 6, por un auxiliar de investigación. Para ello se contó con el acceso a la computadora de la clínica Familiar “Luis Angel García” durante el estudio. Todas las bases de datos así generadas fueron guardadas y revisadas periódicamente.

b. Análisis estadístico

En primer lugar se verificó la exactitud y consistencia interna de los datos. Se utilizó un análisis convencional de frecuencias para la exploración de los distintos datos seguido de un análisis bivariado a través de una prueba de chi cuadrado. Para estos análisis se utilizó el paquete estadístico EPI Info versión 6 y todos los análisis fueron efectuados a un nivel de significancia del 0.05.

III. RESULTADOS

La presentación de resultados de esta investigación ha sido estructurada según los fines principales de la Universidad de San Carlos:

3.1 Docencia:

Que incluye los resultados obtenidos en las capacitaciones docentes brindadas a los estudiantes de EDC y EPS de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, durante la realización de este proyecto.

3.2 Servicio

En esta sección se describe los resultados del diagnóstico de laboratorio de la infección por micobacterias en pacientes viviendo con HIV/SIDA con extensión a otros pacientes del hospital.

3.3 Investigación

Estos resultados exploran la frecuencia y factores asociados en la co-infección tuberculosis y HIV/SIDA.

Cada uno de estos fines y sus resultados se describen a continuación.

3.1 Docencia: Capacitación en el diagnóstico de micobacterias brindadas a los estudiantes de EDC

3.1.1 Capacitación a estudiantes de EDC

Un total de 23 estudiantes recibieron la capacitación de una semana de duración. Para los análisis correspondientes, los estudiantes fueron divididos en dos grupos: Grupo 1 (febrero a junio), en donde se atendieron 12 estudiantes y Grupo 2 (julio a octubre) con atención a 11 estudiantes. La nota promedio del Grupo 1 fue de 83 y del Grupo 2 fue 90 puntos sobre 100. El número total de muestras procesadas por los estudiantes fue de 1,305 (Grupo 1, 593 muestras versus Grupo 2, 712 muestras) (Tabla No. 1).

Tabla No. 1
Distribución de estudiantes durante la capacitación.

	Total	Grupo 1 (feb-jun)	Grupo 2 (jul-oct)
Estudiantes	23	12	11
Evaluación ¹		83/100	90/100
Número de muestras	1,305	593	712

¹ Comparación de promedios significativa; $p < 0.05$; $\alpha = 0.05$

Se recibieron 989 esputos y 316 muestras variadas. De la Consulta Externa se recibieron 532 muestras (incluyendo la Clínica Familiar) y de los servicios de hospitalización 773. Se observaron 108 muestras positivas de esputo y 18 de otras muestras. El Grupo 1 procesó 477 esputos y el Grupo 2 procesó 512 (Tabla No. 2). Se

encontró diferencia significativa, según el tipo de muestra ($p=0.003$; $\alpha= 0.05$) y en las muestras positivas observadas entre los dos grupos ($p=0.008$; $\alpha= 0.05$). Respecto a los servicios atendidos por los estudiantes, no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos ($p= 0.20$; $\alpha= 0.05$).

Tabla No.2
Características de las muestras procesadas durante la capacitación de estudiantes (N= 1305).

Tipo de muestra	Total	Grupo 1 (feb-jun)	Grupo 2 (jul-oct)	Intervalo de confianza ¹ 95%	Valor OR ²	Valor p ³
Espustos	989	477	512	1.22-2.11	1.61	0.003 *
Otro	316	116	200			
Muestras positivas	126	57	69			
Espustos	108	48	60	1.21-3.39	2.03	0.008 *
Otro	18	9	9			
Servicio						
Consulta ext.	532	253	279	0.92-1.45	1.15	0.20
Hospitalizados	773	340	433			

¹ Prueba de Chi cuadrado-Mantel-Haenszel; ² OR= valor del riesgo; ³ Valor de la probabilidad; $\alpha= 0.05$

En la Tabla No. 3 se observan las muestras diferentes a esputo, procesadas durante la capacitación de estudiantes. El total de estas muestras fue de 316, entre las más numerosas están: orina 64, lavado bronquial 46 y líquido cefalorraquídeo (LCR) 45.

Tabla No. 3 Muestras diferentes a esputo procesadas durante la capacitación (N= 316)

Tipo de muestra	Total	Grupo 1 (feb-jun)	Grupo 2 (jul-dic)
Orinas	64	16	48
Lavados bronquiales	46	14	32
LCR	45	24	21
Otros líquidos	28	11	17
Secreciones	27	12	15
Médula Osea	21	10	11
Aspirados gástricos	21	4	17
Abscesos	13	3	10
Huesos	10	1	9
Biopsias	10	4	6
Ganglios	6	3	3
Sangre	5	5	0
No determinado	20	9	11

3.1.2 Capacitación a estudiantes de EPS

Los estudiantes que recibieron la capacitación a través de un taller realizado durante el “3er Curso de Actualización en Laboratorio Clínico” fueron un total de 32.

El mismo fue organizado por el Laboratorio Escuela del Programa de EDC, del 3 al 7 de julio del 2,000. Este taller se desarrolló en dos días (dos grupos) y fue teórico-práctico. Al final de la actividad se entregó un diploma de participación.

3.2 Servicio. Diagnóstico de laboratorio de la infección por micobacterias en pacientes viviendo con HIV/SIDA con extensión a otros pacientes del hospital.

Del procesamiento de las muestras clínicas de los pacientes viviendo con HIV/SIDA y de otros pacientes del hospital los resultados fueron: total de muestras procesadas 1,639 que corresponden a 878 pacientes atendidos, 983 muestras de hombres y 654 muestras provenientes de mujeres. El promedio de muestras por paciente fue de 2. Las baciloscopías positivas fueron 134 (8.3%), cultivos positivos para *Mycobacterium sp* 102 (13%) en 784 muestras a las que les fue requerido el cultivo (Tabla No. 4).

Tabla No. 4
Descripción de las muestras procesadas.

Descripción	Número	Porcentaje (%)
Total muestras procesadas (Min: 1 ; Max 14; Desviación estándar = 1.43)	1639	Promedio: 2 por paciente;
Pacientes atendidos	878	
Género		
Hombres	983	60
Mujeres	654	40
Baciloscopías positivas	134	8.3
Cultivos Positivos (cultivos requeridos = 784)	102	13

El tipo de muestras procesadas se observa en la Tabla No. 5. La muestra de esputo es la de mayor referencia con 1,242 (76%) muestras seguido por muestras de orinas 75 (4.6%), líquidos cefalorraquídeos 59 (3.6%), etc.

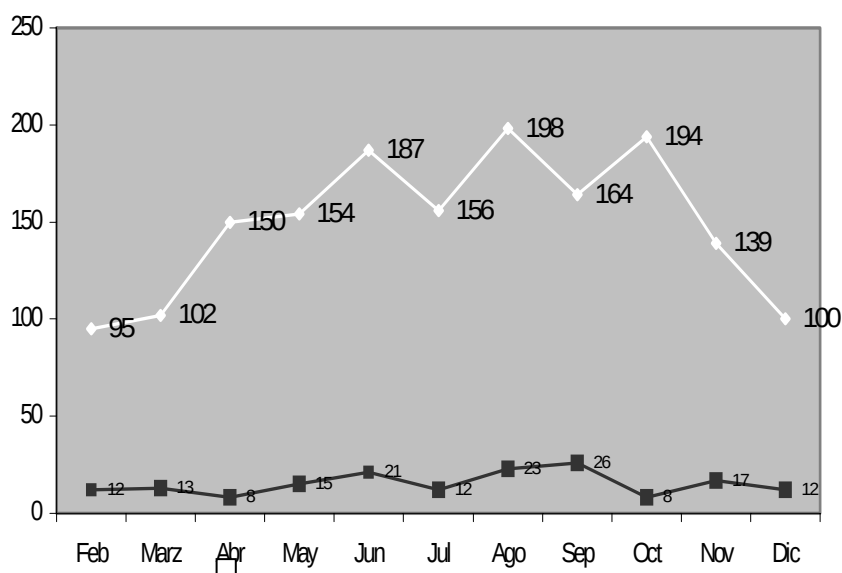
Tabla No. 5
Tipo de muestras procesadas (N= 1639).

Tipo de muestra	Total	%
Espustos	1242	76
Abscesos	14	9
Aspirados gástricos	26	1.6
Aspirados bronquiales	56	3.4
Biopsias de hueso	15	0.9
Ganglios	6	0.4
Sangre	5	0.3
Huesos	11	0.7
No determinado	28	1.7
Líquidos cefalorraquídeos	59	3.6
Otros líquidos	41	2.5
Médula de ósea	25	1.5
Orinas	75	4.6
Secreciones	36	2.2

Se realizó un análisis de la distribución de las muestras procesadas por meses del año. Se observa que en el segundo semestre del año se recibieron mayor cantidad de muestras clínicas. Se registró que los meses de agosto (198), octubre (194) y junio (187) con el mayor número de muestras procesadas (Gráfica No. 1).

Gráfica No. 1
Distribución de muestras por meses de servicio.

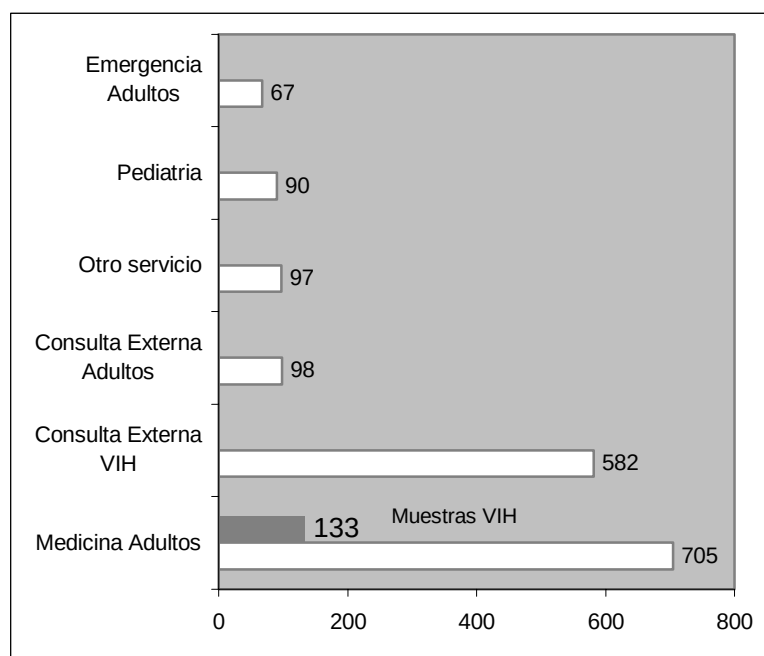
Totales



Totales —■— Positivos

En el número de muestras procesadas por servicio (en la Gráfica No.2) se observa que la Medicina de Adultos (705) refirió el mayor número de muestras al laboratorio, entre las que se encontraban 133 muestras de pacientes HIV positivo que estuvieron hospitalizados. La Clínica Familiar “Luis Angel García” refirió 582 muestras y los otros servicios atendidos fueron: Consulta Externa de Adultos (98), Pediatría (90), Emergencia de Adultos (67) y otros servicios (97).

Gráfica No.2
Distribución de muestras procesadas por servicio. (N = 1,639)



En la Tabla 6, se observa detección de bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR) en los exámenes de baciloscopías y cultivos, para los pacientes HIV positivo y otros pacientes del hospital. En los pacientes HIV positivo se obtuvo 30% de baciloscopías positivas, mientras que en otros pacientes fue 70%, se encontró diferencia significativa entre estos dos grupos ($p < 0.01$; $\alpha = 0.05$). El 52% de los cultivos fueron positivos en pacientes HIV y el 48% en otros pacientes ($p < 0.0$; $\alpha = 0.05$)

Tabla No.6
Detección de BAAR en muestras de esputo de pacientes HIV positivo y otros pacientes (N = 1,168)

	Total	Estado serológico de HIV		OR ¹	IC 95% ²	Valor p ^{3,4}
	n= (%)	Positivo n= (%)	Negativo n= (%)			
Baciloscopía						
Positiva	112 (9)	33 (30)	79 (70)	0.42	0.27-0.65	< 0.01
Negativa	1127 (91)	563 (50)	564(50)			
Cultivo						
Positivo	89 (16)	46 (52)	43 (48)	0.08	0.05-0.15	< 0.01
Negativo	464 (84)	431 (93)	34 (7.3)			

¹ Odds Ratio = factor de riesgo; ² IC= Intervalo de Confianza; ³ Valor P= Valor probabilidad; ³ Prueba de Chi cuadrado Mantel Haenszel; $\alpha = 0.05$

En la Tabla No.7 se observan los resultados obtenidos de positividad en baciloscopía y cultivo para muestras diferentes a esputo. Se observa en estos resultados que no existe diferencia significativa entre las baciloscopías y cultivos con respecto a los pacientes de HIV/SIDA y otros pacientes del hospital ($p > 0.05$; $\alpha = 0.05$).

Tabla No. 7
Detección de BAAR en muestras diferentes a esputo de pacientes HIV positivo y otros pacientes (N=397)

	Total	Estado serológico de HIV		OR ¹	IC _{95%} ²	Valor p ^{3,4}
	n (%)	Positivo n (%)	Negativo n (%)			
Baciloscopía						
Positiva	22 (6)	7 (32)	15 (68)	0.74	0.26-2.02	0.52
Negativa	358 (94)	138 (38)	220 (62)			
Cultivo						
Positivo	13 (6)	5 (38)	8 (62)	0.48	0.13-1.72	0.20
Negativo	213 (94)	120 (56)	93 (44)			

¹Odds Ratio = factor de riesgo; ²IC= Intervalo de Confianza; ³Valor P= Valor probabilidad; ⁴Prueba de Chi cuadrado Mantel Haenszel; $\alpha = 0.05$

Con respecto a las cepas de micobacterias aisladas durante el año 2,000. Se determinó que *Mycobacterium tuberculosis* fue la especie más aislada, tanto en los pacientes HIV positivo (48.2%), como en los otros pacientes del hospital (50.3%). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla No. 8.

Tabla No.8
Porcentaje de aislamiento de especies de micobacterias.

Población	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> n (%)	Otras micobacterias n (%)	No determinadas ¹ n (%)
HIV negativo	43 (50.6)	4(50)	4(44.4)
HIV positivo	41(48.2)	4(50)	4(44.4)
Indeterminado ²	1(1.2)	0(0)	1(11.1)
Total	85(100)	8(100)	9(100)

¹ No determinadas : cepas que no sometidas a procedimientos de identificación, por contaminación, crecimiento pobre, etc. ²Indeterminado: cepas de pacientes cuyo resultado a la prueba de HIV es desconocido.

3.3 Investigación: Frecuencia y factores asociados en la co-infección tuberculosis y HIV/SIDA

De un total de 237 entrevistas efectuadas en esta parte del proyecto se eliminaron 10 (4.22%) de ellas por no contar con los datos respectivos de baciloscopías o cultivos. Los datos recolectados en estos pacientes se presentan en dos secciones: la primera muestra la frecuencia, tipo de muestras procesadas y micobacterias aisladas; mientras la segunda parte incluye el estudio de algunos factores asociados a la coinfección tuberculosis-HIV/SIDA.

3.3.1 Frecuencia, tipo de muestras procesadas y micobacterias aisladas

La positividad a micobacterias por paciente, dependiendo del método utilizado fue de 11.6% para baciloscopías, 18.2% para el cultivo y de 21.6% para observación directa y cultivo combinados. Los datos se detallan en la Tabla No. 9.

Tabla No. 9
Frecuencia de positividad por paciente de micobacterias según los métodos de detección utilizados

Método	Positivo n (%)	Negativo n (%)	Total
Baciloscopías	26 (11.6)	198 (88.4)	224 (99)
Cultivo	38 (18.6)	166 (81.4)	204 (90)
Observación Directa más Cultivo	49 (21.6)	178 (78.4)	227 (100)

La sensibilidad y especificidad de la observación directa de bacilos alcohol-ácido resistentes (BAAR) contra el cultivo de micobacterias fue de 40% y 95% respectivamente, como se observa en la Tabla No. 10.

Tabla No.10
Comparación sensibilidad y especificidad, observación directa versus cultivo* de micobacterias

Observación	Cultivo		Total n (%)
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Observación Directa **			
Positivo	15 (65)	8 (35)	23 (11)
Negativo	22 (12)	156 (88)	178 (88)
Total	37 (18)	164 (82)	201
Sensibilidad 40%; Especificidad 95%			

- * Cultivos confirmados con crecimiento, ** Ziehl -Neelsen

Como se establece en la Tabla No. 11, dependiendo del tipo de muestra, el porcentaje de positividad de las mismas disminuyó en el siguiente orden: biopsia pleural, líquido pleural, lavado bronquial y broncoscopia (100%), aspirado de ganglio (58%), esputo (25%), sangre (24%), secreción (22%) orina (13%), médula ósea (8%), aspirado bronquial (5%) y otros (0%).

Tabla No. 11
Porcentaje de positividad según tipo de muestra (N = 392)

Muestra	Total	Numero de positivos	Porcentaje (%)
Espuito	204	53	25
Medula ósea	61	5	8
Liquido cefalorraquideo	22	0	0
Sangre	29	7	24
Hueso	10	0	0
Orina	15	2	13
Aspirado de ganglio	12	7	58
Aspirado bronquial	5	0	5
Piel	8	0	0
Secreción	18	4	22
Biopsia pleural	1	1	100
Cepillado bronquial	1	0	0
Liquido Pleural	1	1	100
Lavado bronquial	1	1	100
Broncoscopia	1	1	100
Total	392	81	20.6

De los cultivos obtenidos de pacientes HIV positivo, se lograron identificar como *Mycobacterium tuberculosis*, 41 cepas (84%), otras especies de *Mycobacterium* , 4 cepas (8%), además no fue posible someter a procedimientos de identificación a 4 cepas (8%), debido a presencia de bacterias contaminante o a cultivos con crecimiento insuficiente. La Tabla No. 12 detalla estos resultados.

Tabla No.12
Especies de micobacterias identificadas en pacientes HIV positivo (N= 49)

Especie	n	Porcentaje (%)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	41	84
Otras micobacterias	4	8
No identificadas*	4	8

*Cultivos mixtos o con crecimiento insuficiente

3.3.2 Factores asociados a la coinfección tuberculosis-HIV/SIDA.

Para la determinación de factores de riesgo, se analizaron diversos aspectos, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas con respecto a el nivel educacional ($p = 0.03$; $\alpha = 0.05$), tiempo en el que el paciente permaneció privado de libertad ($p = 0.03$; $\alpha = 0.05$), también sobresale el género del paciente ($p = 0.06$; $\alpha = 0.05$), que se encuentra en el límite ($p = 0.056$). Otros factores que se presentan en la Tabla No. 13 no estuvieron estadísticamente asociados a ambas infecciones.

Tabla No.13
Descripción demográfica de los pacientes entrevistados (N= 227)

Característica	Total n (%)	Diagnóstico micobacterias ¹		OR ²	IC _{95%} ³	Valor p ^{4,5}
		Positivo n (%)	Negativo n (%)			
Tipo de paciente						
- Ambulatorio	187 (82)	39 (21)	148 (79)	0.79	0.33-1.91	0.56
- Hospitalizado	40 (18)	10 (25)	30 (75)			
Género						
- Masculino	166 (73)	41 (25)	125 (75)	2.17	0.92-5.72	0.06
- Femenino	61 (27)	8 (13)	53 (87)			
Edad				3.05	0.75-3.05	0.21
- Menor o igual de 32 años	121 (53)	30 (25)	91 (75)			
- Mayor o igual de 32 años	106 (47)	19 (18)	87 (82.1)			
Estado civil						
- Casado	83 (37)	13 (16)	70 (84)	0.56	0.26-1.19	0.10
- Otro	144 (63)	36 (25)	108 (75)			
Residencia						
- Otro departamento	68 (30)	16 (24)	52 (76)	1.17	0.56-2.45	0.64
- Capital o municipio de Guatemala	159(70)	33 (21)	126 (79)			
Nivel educacional						
- Ninguno	23 (10)	9 (39)	14 (61)	2.64	0.96-7.14	0.03 ⁶
- Otro	204 (90)	40 (20)	164 (80)			
Haber estado de privado de libertad						
- Sí	79 (35)	22 (28)	57 (72)	1.73	0.86-3.48	0.09
- No	148 (65)	27 (18)	121 (82)			
Tiempo privado de libertad						
- 1- 6 meses	27 (12)	10 (37)	17 (67)	2.43	0.94-6.21	0.03
- Otro	200(88)	39(19.5)	161 (81)			

¹ Baciloscopía o cultivo positivo ² Odds Ratio = factor de riesgo; ³ IC= Intervalo de Confianza; ⁴ Valor p= Valor probabilidad; ⁵ Prueba de Chi cuadrado Mantel-Haenszel; $\alpha = 0.05$; ⁶ Prueba de Fisher.

En la Tabla No. 14 se enlistan los datos obtenidos del análisis de factores relacionados con el trabajo y la vivienda de los pacientes. Estos incluyen: tipo de vivienda, número de habitaciones, número de personas por habitación, persona que elabora los alimentos, material para cocinar, empleo y salario, en ninguno se observa diferencia significativa ($p > 0.05$; $\alpha = 0.05$).

Tabla No.14
Factores asociados a trabajo y vivienda (N= 227)

Característica	Total n (%)	Diagnóstico micobacterias ¹		OR ²	IC _{95%} ³	Valor p ^{4,5}
		Positivo n (%)	Negativo n (%)			
		n= 49 (22%) n= 178 (78%)				
Tipo de vivienda						
-Propia	128 (56)	26(20)	102(78)	0.84	0.42-1.68	0.59
-Otro	99 (44)	23 (23)	76 (77)			
Número de habitaciones						
- Una habitación	56 (25)	10 (18)	39(23)	0.74	0.1-1.69	0.43
- Más de una habitación	171 (75)	46 (82)	132 (77)			
Quien cocina						
- El mismo paciente	55 (24)	9 (16.)	46 (84)	0.65	0.27-1.53	0.28
- Otro	172 (76)	40 (23)	132 (77)			
Material para cocinar						
- Gas propano	160 (71)	32 (20)	128(80)	0.74	0.35-1.53	0.36
- Otro	67 (29)	17(25)	50(75)			
Tiene trabajo						
- Si	72 (34)	15 (21)	57(79)	0.96	0.45-2.06	0.92
- No	140(66)	30 (21)	110 (79)			
Salario mensual						
- Más de 1500	34(15)	6(18)	28(82)			
- Menos de 500 a 1500	193 (85)	43(22)	150(78)	1.34	0.48-3.90	0.54
Desplazado a otro lugar por trabajo						
- Si	61 (29)	9 (15)	52 (85)	0.54	0.22-1.29	0.13
- No	149 (71)	36 (24)	113 (76)			

¹ Baciloscopia o cultivo positivo ² Odds Ratio = factor de riesgo; ³ IC= Intervalo de Confianza; ⁴ Valor p= Valor probabilidad; ⁵ Prueba de Chi cuadrado Mantel-Haenszel; $\alpha = 0.05$;

De los factores clínicos asociados a ambas co-infecciones se determinó que tratamiento actual ($p=0.04$; $\alpha=0.05$), resultados de rayos X normales ($p=0.06$; $\alpha=0.05$), fueron factores significativos mientras estar hospitalizado o no ($p=0.43$; $\alpha=0.05$) y tiempo de hospitalización ($p=0.53$; $\alpha=0.05$), como se muestra en la Tabla No. 15 no presentaron ninguna asociación.

Tabla No. 15
Factores clínicos asociados (N= 227)

Característica	Diagnóstico micobacterias ¹			OR ²	IC 95% ³	Valor p ^{4,5}
	Total n (%)	Positivo n (%) n= 49 (22%)	Negativo n (%) n= 178 (78%)			
Ha estado hospitalizado						
- Si	142 (63)	33 (23)	109 (77)	1.31	0.63 – 2.71	0.43
- No	85 (37)	16 (19)	69 (81)			
Hace cuanto tiempo estuvo hospitalizado						
- < 1 - 4 semanas	121 (53)	28 (23)	93 (77)	1.22	0.61-2.44	0.53
- > 4 semanas	106 (47)	21 (19)	85 (80)			
Resultados de Rayos X normales						
- Si	71 (31)	10 (14)	61 (86)	0.49	0.21-1.12	0.06
- No	156 (69)	39 (25)	117 (75)			
Tratamiento actual						
- Si	27 (12)	10 (37)	17 (63)	2.4	0.93- 6.13	0.04
- No	198 (88)	39 (20)	159 (80)			

¹ Baciloscopia o cultivo positivo ² Odds Ratio = factor de riesgo; ³ IC= Intervalo de Confianza; ⁴ Valor p= Valor probabilidad; ⁵ Prueba de Chi cuadrado Mantel-Haenszel; $\alpha=0.05$.

IV. DISCUSION

4.1 Docencia: Capacitación en el diagnóstico de micobacterias brindadas a los estudiantes de EDC y EPS de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Uno de los objetivos de esta investigación fue brindar capacitación a estudiantes del Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad (EDC), que realizan prácticas de laboratorio clínico en el Hospital General San Juan de Dios. Esta capacitación consistió de dos actividades primordiales: 1) curso de una semana a estudiantes en el ciclo regular de estudios y 2) un taller de diagnóstico de micobacterias, ejecutado en el mes de julio. Ambas modalidades y sus resultados son discutidos a continuación.

4.1.1 Capacitación a estudiantes de EDC

La capacitación teórico-práctica de una semana se efectuó en 3 a 4 horas diarias, en grupos de 1 a 3 estudiantes máximo. Como capacitadoras se contó con un auxiliar de investigación y la coordinadora del proyecto. Durante esta semana se incluyeron clases magistrales y presentación de un video, relacionado con la toma y manejo de muestras, incluyendo los temas de bioseguridad en el laboratorio y manejo apropiado de campanas de flujo laminar. Se aplicaron las técnicas para realizar baciloscopias, cultivo, aislamiento e identificación de micobacterias.

El número total estudiantes capacitados fue de 23. De este total, se reconocieron dos grupos de estudiantes, por período de capacitación: Grupo 1 con capacitación de febrero a junio (12 estudiantes) y Grupo 2 con capacitación de julio a octubre (11 estudiantes) (Tabla No.1).

Luego de la evaluación el Grupo 1 obtuvo una nota promedio significativamente menor a la observada en el Grupo 2. Una posible explicación para esta diferencia podría consistir en que el Grupo 1 fue el último grupo de estudiantes regulares de EDC que se recibió durante el año 2,000. La mayoría de estos estudiantes cursaban los penúltimos semestres de la carrera de Química Biológica. A este nivel el pensum de estudios aun no incluye el tema de tuberculosis, por lo que esta capacitación fue su primer contacto con el diagnóstico microbiológico de micobacterias. A diferencia, el Grupo 2 eran estudiantes del último semestre de la carrera. En este semestre, el pensum de estudios incluye el tema de tuberculosis con una clase magistral y un laboratorio de 2 horas de duración a grupos de 25 estudiantes en el mejor de los casos. Esto podría indicar que este Grupo 2 tenía algún conocimiento previo acerca de este tema y por ello su mayor rendimiento.

Con respecto al número de muestras analizadas durante la capacitación, se procesaron un total de 1,305 muestras (593 muestras en Grupo 1 versus 712 muestras en el Grupo 2; $p=0.003$; $\alpha=0.05$). Esta diferencia puede explicarse por el flujo natural de trabajo que se recibe en el laboratorio clínico del hospital. Regularmente se atiende un mayor número de pacientes en el segundo semestre del año pues el mismo no existen asuetos largos como el de Semana Santa. El Grupo 2 procesó mayor cantidad de muestras de esputo y otras muestras; y observó más muestras positivas en comparación con el Grupo 1.

Esto puede estar asociado al número de muestras procesadas por cada grupo ($p= 0.008$; $\alpha=0.05$).

En cuanto a los servicios atendidos no se encontró diferencia significativa entre los dos grupos (Tabla No.2). También se observa que se procesaron una gran cantidad de muestras provenientes de la Clínica Familiar “Luis Angel García” con lo que los estudiantes pudieron figurar la magnitud del problema del diagnóstico de micobacterias en la población HIV/SIDA de este hospital.

Las muestras clínicas diferentes a esputos constituyeron un total de 316 muestras (24%; 316/1305). El manejo de estas muestras es muy importante, ya que únicamente en laboratorios de hospitales de gran tamaño como el Hospital General San Juan de Dios se tiene la oportunidad de trabajar con un variado tipo de muestras clínicas. Estas muestras necesitan procedimientos especiales y diferentes a los que se hacen con los esputos, por lo que brindó una oportunidad única de integrar el manejo de estas muestras en este programa de capacitación (Tabla No 3).

4.1.2 Taller de capacitación en el diagnóstico de micobacterias a estudiantes de EPS

La otra actividad incluida en el programa docente de este estudio fue la realización de un taller de dos días para 32 estudiantes de Ejercicio Profesional Supervisado (EPS) de la Escuela de Química Biológica. Durante el mismo se reforzaron aspectos teóricos de la enfermedad tratados por especialistas como infectólogos, además de la capacitación teórica-práctica enfatizando el tema de bioseguridad en el manejo de las micobacterias. Los estudiantes trabajaron bajo estrictas normas de seguridad y tuvieron la oportunidad de conocer y manejar una campana de flujo laminar.

Esta actividad contribuyó no solamente a que estos estudiantes se prepararán para el diagnóstico de micobacterias sino también como futuros enlaces del diagnóstico de la tuberculosis y referencia de muestras, entre los centros hospitalarios del interior de la república y el Laboratorio Central de Referencia del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

4.2 Servicio: Diagnóstico de laboratorio de la infección por micobacterias en pacientes viviendo con HIV/SIDA con extensión a otros pacientes del hospital.

El Hospital General San Juan de Dios es uno de los centros hospitalarios más grandes de Guatemala, se calcula que atiende aproximadamente 2, 000 pacientes diarios en la Consulta Externa y 500 pacientes hospitalizados. Es del dominio público que este hospital enfrenta una grave crisis al nivel de infraestructura, equipo y personal capacitado. Esta crisis se refleja en todos los servicios del hospital, entre los que se incluye el Laboratorio de Microbiología; por esta razón, en 1,999 el diagnóstico de tuberculosis se limitó a baciloscopias (observaciones directas) y a unos pocos cultivos que no fueron procesados adecuadamente, por lo que durante todo un año, se registro el aislamiento de una única cepa de *Mycobacterium sp.* Este hecho es particularmente preocupante, si se considera que la asociación entre tuberculosis (TB) y HIV tiene efectos devastadores, tanto en las personas viviendo con HIV/SIDA como en la población en general.

Ante esta situación el objetivo, planteado inicialmente, de mejorar el diagnóstico de la tuberculosis únicamente en personas HIV/SIDA, exigía su aplicación y extensión a otros pacientes del hospital. Al final se pudo comparar los resultados de muestras provenientes de pacientes con HIV/SIDA y el resto de la población del hospital.

Se analizaron un total de 1,639 muestras provenientes de 878 pacientes atendidos (44% HIV positivo y otros pacientes del hospital). Es de hacer notar que para propósitos de este informe todos los análisis de esta sección se realizaron sobre la base del número de muestras clínicas procesadas y no sobre el número de pacientes. El análisis de resultados por paciente se llevará a cabo posteriormente.

Puede observarse que se procesaron otro tipo de muestras diferentes a esputo, como LCR, ganglios, biopsias, sangre, médula ósea, etc., (Tabla No 4.). Anteriormente muchas de estas muestras se recibían en el laboratorio, pero algunas veces no eran procesadas, ya que no se contaba con el personal capacitado ni equipo apropiado para hacerlo. Esta investigación demuestra la necesidad de contar con un diagnóstico especializado para el procesamiento de este tipo de muestras clínicas.

Se observó una mayor cantidad de muestras provenientes de hombres que de mujeres. Esto puede explicarse ya que el predominio de atención del hospital regularmente incluye mas población masculina que femenina. Dicho patrón también se ha observado en las personas HIV/SIDA que atiende este hospital.

En la distribución de muestras procesadas totales y positivas por meses del año, se observa que el mayor número de muestras procesadas y positivas se observaron durante el segundo semestre del año (Gráfica No.1). Esto puede estar asociado a un mayor número de pacientes atendidos durante el segundo semestre y al hecho de que el Hospital San Juan de Dios se ha visto sobrecargado por ser el único hospital público que no incluye cobros en la mayoría de sus servicios.

Con respecto a la distribución del número de muestras por servicio del hospital (Gráfica No. 2) la Medicina de Adultos y la Clínica Familiar presentan el mayor número de muestras procesadas. Dos posibles explicaciones pueden aclarar este hecho: 1) alta endemicidad de la tuberculosis en nuestro país y 2) la asociación existente entre la infección HIV/SIDA y tuberculosis.

En la tabla No.6 los resultados de la detección de BAAR en muestras de esputo en pacientes HIV positivo y otros pacientes presentaron una diferencia significativa para la baciloscopia u observación directa ($p < 0.01$; $\alpha = 0.05$). Los pacientes HIV positivo mostraron solamente el 42% de probabilidades de positividad ($OR = 0.42$) en baciloscopias versus otros pacientes. Se ha documentado que aproximadamente el 50% de las muestras de esputo de pacientes HIV positivo infectados con tuberculosis pulmonar son negativas para la detección de BAAR (18). A los pacientes HIV/SIDA les resulta difícil expectorar y en la mayoría de los casos no es posible obtener una adecuada muestra de esputo. Actualmente existe un debate con respecto a que si la nebulización y/o otros métodos invasivos como la broncoscopia son más sensibles para la detección de micobacterias en

estos pacientes (19). El porcentaje de positividad para BAAR en cultivos del grupo de pacientes HIV positivo es mejor que el obtenido solo por baciloscopía. En la mayoría de casos de diagnóstico microbiológico y especialmente en el diagnóstico de tuberculosis, los cultivos han sido documentados como medianamente sensibles, pero muy específicos (20). Por esta razón es indispensable que todas las muestras de esputo y otras muestras, aunque presenten observación directa negativa, deben cultivarse con el objetivo de aumentar la probabilidad de aislar estas bacterias. Con ello no sólo se demostraría su prevalencia si no también aumentaría el conocimiento del tipo de micobacterias y la susceptibilidad antibiótica de las mismas.

La tuberculosis extrapulmonar es comúnmente observada en pacientes HIV/SIDA (21) por lo que se recomienda especialmente el procesamiento de muestras diferentes a esputo para diagnosticar la infección (Tabla No 7). Estos resultados son similares en ambos grupos ($p < 0.05$; $\alpha = 0.05$)

En las 784 muestras de todas las muestras que requirieron cultivo, 102 (13%) fueron positivas para cepas de *Mycobacterium*. De éstas se aislaron 89 (91.7%) *M. tuberculosis* y 8 (8.2%) de otras micobacterias. Nueve cepas no se incluyeron en la identificación, ya que no fue posible recuperarlas puras de los cultivos originales. Con las cepas así identificadas se formó un cepario el cual se utilizará en investigaciones futuras de susceptibilidad antibiótica y biología molecular (Tabla No.8).

Para finalizar estos resultados demuestran que el laboratorio de micobacterias contribuyó de manera crucial al diagnóstico de tuberculosis en este hospital. El servicio ofrecido fue altamente eficiente, entregándose los resultados de baciloscopias, al día siguiente de recibida la muestra o el mismo día cuando fue posible.

4.2.1. Procesamiento de muestras en pacientes viviendo con HIV/SIDA

La tuberculosis es endémica en la mayoría de países de Latinoamérica y su prevalencia se ha visto aumentada con el surgimiento de la epidemia del HIV/SIDA. Por esta razón, es imperativo conocer como la tuberculosis, como un ente clínico aislado se comporta en el contexto de la epidemia de VIH/SIDA, que ya azota a los empobrecidos sistemas de salud de los países en desarrollo.

En la tabla No.9 la prevalencia de tuberculosis, representa más de una quinta parte (21.6%) de las infecciones oportunistas en esta población. Este resultado es menor al que reporta el Programa Nacional de Prevención del SIDA, que ha estimado que aproximadamente el 30% de los pacientes con SIDA también padecen de tuberculosis(22). Sin embargo este último dato debe tomarse con precaución, ya que fue estimado sobre la base de diagnósticos clínicos presuntivos.

Por otra parte datos de la Clínica Familiar indican que esta infección es el marcador inicial de SIDA en estos pacientes (comunicación personal, Dr. Eduardo Arathoon, CFLAG, Hospital General San Juan de Dios).

El uso único de baciloscopías no permitió llegar a comprobar la presencia o ausencia de una infección por micobacterias (11.6% observación directa versus 18.6% cultivo) (Tabla 9). A pesar de que la especificidad de las baciloscopías fue alta, (95%) con respecto a los cultivos, su sensibilidad es sumamente baja (40%) (Tabla No. 10). Estos hechos indican situaciones importantes como: 1) en el diagnóstico de micobacterias en pacientes HIV/SIDA es imperativo contar con herramientas de diagnóstico de laboratorio. Esto no solo brinda información valiosa acerca de la infección sino también permite incluir diagnósticos más certeros y apropiados, así como determinar la exacta prevalencia de esta infección en estos pacientes para intervenciones de salud pública futuras.

Comparaciones de estos resultados con estudios recientes (1994 y 1997) realizados en un municipio de Rio de Janeiro, mostraron que la tasa de co-infección de TB/HIV estaba entre el 10 al 12%. Ante este cuadro epidemiológico se concluye que los pacientes de esta muestra presentan aproximadamente el doble de este porcentaje (21.6%). Esto hace discutir la necesidad de realizar pruebas de HIV a todos los pacientes con tuberculosis atendidos en los servicios públicos de salud (23).

El número de muestras (Tabla No.11) procesadas en esta población de pacientes alcanzó un total de 392. Se debe señalar que la mayor cantidad de muestras procesadas fueron esputos, los que alcanzaron una positividad del 11.6%. A pesar de que otras muestras se presentan en menor número, las mismas presentan una positividad similar o mayor a los esputos, mostrando una mayor sensibilidad. La menor frecuencia de estas muestras puede explicarse por la falta de recursos en este hospital que no permiten hacer otros procedimientos en este tipo de pacientes.

Con respecto a la identificación de las distintas micobacterias se observa que cerca del 84% (41) son cepas de *M. tuberculosis*, sin embargo se detectó un 8% (4) de micobacterias no tuberculosas. Estos datos pueden reflejar dos hechos importantes: 1) la presencia de *M. tuberculosis* asemeja el patrón endémico de esta especie en la población guatemalteca y 2) la falta de recursos y herramientas diagnósticas que no ha permitido determinar hasta ahora la verdadera prevalencia de otras micobacterias como el complejo de *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) en los pacientes HIV/SIDA en Guatemala.

4.3 Investigación: Frecuencia y factores asociados en la co-infección tuberculosis y HIV/SIDA.

4.3.1 Factores demográficos asociados

Con respecto a los factores demográficos asociados a la infección por HIV/SIDA-tuberculosis se observa que los pacientes hospitalizados no presentan diferencia con respecto a los pacientes ambulatorios ($p=0.56$; $\alpha=0.05$). Esto puede indicar que ambas infecciones no se constituyen en un factor frecuente para la hospitalización. Datos no publicados de la Clínica Familiar “Luis Angel García” han mostrado que más de la mitad de los pacientes HIV positivo son diagnosticados durante su estancia hospitalaria (Dr. Eduardo Arathoon, comunicación personal).

A pesar de ser marginalmente significativo ($p= 0.06; \alpha= 0.05$) en esta muestra de pacientes se observa el predominio del género masculino (73% hombres versus 27% mujeres). Los pacientes masculinos tienen 2 veces más riesgo de presentar infección por micobacterias. Esta situación puede explicarse como: 1) la tendencia del hospital de recibir más población masculina; 2) el patrón actual de incidencia del HIV/SIDA en Guatemala, se presenta en su mayoría en hombres y 3) factores culturales como el que las mujeres permanecen en casa a cargo del hogar y de los hijos y acuden a los centros hospitalarios en casos extremos de enfermedad.

La edad promedio de los pacientes HIV/SIDA co-infectados con tuberculosis fue de 32 años (min 18; max 60). Lo cual se confirma con las publicaciones respectivas, que en los países en vías de desarrollo, el mayor número de casos HIV+-TB se da en la población menor de 50 años y que ambas epidemias están causando impacto en la grupos de población en edad reproductiva y económicamente activa. La edad no fue un factor asociado a la aparición de infección por micobacterias en estos pacientes ($p= 0.21; \alpha= 0.05$). Similar a la edad, el estar casado y el lugar de residencia no fueron factores asociados a estas dos infecciones ($p= 0.10; p= 0.64; \alpha= 0.05$, respectivamente). Contrario a estos hechos los pacientes analfabetos presentaron aproximadamente 3 veces más riesgo significativo de desarrollar ambas infecciones ($p= 0.03; \alpha= 0.05$). Esto puede explicarse ya que tanto la tuberculosis como la infección HIV/SIDA, están atacando a los estratos mas bajos tanto culturales como socioeconómicos en países en vías de desarrollo (1).

Aunque el haber estado en prisión (35%) no resultó un factor significativo en esta muestra de pacientes ($p= 0.09; \alpha= 0.05$), debe notarse que el tiempo en prisión fue un hecho significativo de riesgo para padecer tuberculosis. Es interesante observar que el periodo de 1-6 meses de prisión, fue el único factor que resulto significativo ($p= 0.03; \alpha= 0.05$). En países como Guatemala, presentan, las cárceles presentan una alta prevalencia de tuberculosis debido al hacinamiento, condiciones higiénicas, mal nutrición, etc. Este periodo también puede representar un intervalo de tiempo suficiente para contagiarse y a la vez no lo suficientemente largo para presentar síntomas que indicarán tuberculosis y su tratamiento respectivo durante el encarcelamiento.

4.3.2 Factores asociados a trabajo y vivienda

Con respecto a factores asociados a vivienda y trabajo se observa (Tabla No. 14) que tanto tipo de vivienda, número de habitaciones y personas en una vivienda no constituyeron factores significativos para adquirir infección por micobacterias en este grupo de pacientes ($p > 0.05; \alpha= 0.05$). Llama la atención el hecho de que el número de personas por vivienda no fuera un factor significativo en esta población ya que el mismo ha sido reconocido como un factor importante de contagio. Al encontrar esta situación se analizó el número personas por número de habitaciones, sin embargo por contar con una muestra muy pequeña de pacientes no fue posible efectuar este análisis.

En las condiciones de trabajo se observa que solamente la tercera parte de los pacientes (34%) tenían un trabajo al momento de la entrevista. El trabajar y devengar un salario no constituyeron factores asociados para tener tuberculosis ($p > 0.05; \alpha= 0.05$). A pesar de esto, este hecho refleja los pocos recursos económicos con los que cuenta esta

población para lidiar con el impacto socioeconómico de ambas enfermedades en el desarrollo a escala individual, familiar y social.

4.3.3 Factores clínicos asociados

A pesar de que de 220 (97%) pacientes entrevistados manifestaron síntomas como tos persistente y fiebre, los mismos no fueron asociados significativamente a la presencia de tuberculosis ($p > 0.05$; $\alpha = 0.05$; análisis no mostrados). Esto enfatiza la necesidad de contar con herramientas de detección de micobacterias a nivel de laboratorio para realizar diagnósticos diferenciales apropiados. Los síntomas de la tuberculosis pulmonar son parecidos a los de otras infecciones: neumonías de diversa etiología, micosis respiratorias, etc., por lo que su diferenciación se hace indispensable especialmente en pacientes con co-infección por HIV ya que la presentación en estos pacientes es totalmente atípica.

Similar a lo encontrado a la presencia de síntomas, el haber estado hospitalizado y el tiempo de hospitalización no constituyeron factores asociados a la presencia de tuberculosis ($p > 0.05$; $\alpha = 0.05$). Probablemente porque estos pacientes desconocían si tenían la infección o se encontraban en las etapas tempranas del SIDA y aun no necesitaban servicios de hospitalización.

Un hallazgo significativo es que existe un 49% de probabilidades ($p = 0.06$; $\alpha = 0.05$) de tener tuberculosis cuando se observan placas de rayos X normales. Esto puede reflejar la presentación atípica de esta infección en estos pacientes y también el hecho de que en muchos casos la infección por micobacterias es extrapulmonar (21). También se observa que los pacientes con tratamiento actual de tuberculosis conllevan a ser diagnosticados 2 veces más ($OR = 2.4$; $p = 0.04$; $\alpha = 0.05$). Esto refleja que los diagnósticos presuntivos realizados clínicamente son acertados por parte del personal médico de la Clínica Familiar.

4.4 Otros logros importantes alcanzados en el proyecto

Se preparó el DNA de 51 cepas de *Mycobacterium* sp. para ser analizadas por la técnica de DRE-PCR. Este método se utiliza principalmente para epidemiología molecular y entre las aplicaciones del mismo están, la detección de brotes de tuberculosis en grupos de población específicos y detección de casos de tuberculosis nosocomial.

El análisis se llevó a cabo en la Universidad de Berkeley, fue realizado por la Licda. Ana María Xet. El objetivo fue formar los "clusters" (grupos de cepas con características genéticas similares) de las cepas aisladas de la población del Hospital General San Juan de Dios. El análisis debe complementarse con la información epidemiológica de cada paciente. Los resultados fueron enviados al equipo de investigación, la discusión y conclusiones de los mismos serán objeto de una publicación posterior.

V. CONCLUSIONES

- a. La aplicación de técnicas microbiológicas para el diagnóstico de infecciones por micobacterias, en el programa de EDC del Hospital General San Juan de Dios, permitió la capacitación adecuada de estudiantes de Química Biológica.
- b. La implementación de técnicas de baciloscopía, cultivo, aislamiento e identificación de micobacterias, en el laboratorio de Microbiología del Hospital General San Juan de Dios, permitió ofrecer un servicio diagnóstico altamente eficiente, no solo a pacientes atendidos en la Clínica Familiar "Luis Angel García", sino también a los que se encuentran en los diferentes servicios de este centro asistencial.
- c. La prevalencia de tuberculosis en pacientes viviendo con HIV/SIDA que acuden a la Clínica Familiar "Luis Angel García" es de 21.6%.
- d. La detección de BAAR en pacientes viviendo con HIV/SIDA, deben realizarse, en forma combinada, baciloscopía y cultivo de muestras.
- e. El porcentaje de *Mycobacterium tuberculosis*, aislado de los pacientes viviendo con HIV/SIDA fue de 84 %.
- f. El porcentaje de otras especies de *Mycobacterium*, aisladas de los pacientes viviendo con HIV/SIDA fue de 8 %.
- g. Los factores asociados para adquirir una infección por micobacterias en pacientes viviendo con HIV/SIDA son: género, ningún nivel educacional, tiempo privado de libertad, recibir tratamiento anti-tuberculoso actualmente y rayos X normales.

VI. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en este proyecto demuestran que la implementación de un laboratorio especializado en el diagnóstico de micobacterias, es crucial para la detección y el aislamiento de las mismas. Es preocupante el hecho de que un centro asistencial de la magnitud del Hospital del San Juan de Dios, no cuente con los recursos propios ni el personal capacitado para asegurar el funcionamiento continuo de un laboratorio de micobacterias, principalmente ahora que la epidemia del SIDA agravó la situación de la tuberculosis, ya endémica en nuestro país.

La principal recomendación y preocupación de los investigadores, es conseguir los fondos para el funcionamiento del referido laboratorio y concientizar a la autoridades correspondientes para que asignen el personal y recursos necesarios para que el laboratorio siga funcionando.

Otra recomendación importante es continuar con la capacitación de estudiantes de Química Biológica, estudiantes en EPS y otro personal de salud, ya que son las futuras generaciones de profesionales, las que enfrentarán en mayor grado la epidemia del SIDA y sus consecuencias. Se ha estimado que la curva de aceleración de la epidemia del SIDA en Guatemala, se estabilizará hasta el año 2,015. Por lo tanto debe ofrecerse a los futuros profesionales conocimientos integrales que les ayuden a realizar diagnósticos de las enfermedades infecto-contagiosas que aquejan a los guatemaltecos.

Debido a la ausencia casi total de datos en nuestro país, se recomienda continuar con estudios de epidemiología de tuberculosis, especialmente en poblaciones específicas, como personas viviendo con HIV/SIDA, para conocer a profundidad la dinámica de esta infección dentro de la población guatemalteca.

VII. REFERENCIAS

1. SHINNICK, T.M. , KING, C.H., QUINN, F.D. – *Molecular biology, virulence, and pathogenicity of mycobacteria*.- En American Journal of Medical Sciences.- 1995.
2. KOLMOS, H.J., BRAHM, M. BRUUN, B. – *Mycobacterium fortuitum in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis*. - En Scandinavian Journal of Infectious Diseases.- 1992.
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION. –*Report on the Tuberculosis Epidemic*.- Geneva: 1996.
4. DCCOCK, K.M., BINKIN, N.J., ZUBER, N.J., et al. - *Research issues involving HIV – associated tuberculosis in resource poor countries*. – En JAMA.- 1996.
5. DCCOCK, K.M., SORO, B., COUBALY, I.M., et al. –*Tuberculosis and HIV infection in SubSaharan Africa*.- En JAMA.- 1992.
6. WORLD HEALTH ORGANIZATION. –*Report on the Tuberculosis Epidemic*.- Geneva: 1997.
7. MORALES, R.E., et al. –*Demographic characteristics associated with late initiation of health care in patients with HIV/AIDS in Guatemala*.- En International Conference of AIDS.- 1998.
8. ARATHOON, E., et al. –*Trends and patterns in HIV/AIDS epidemic in Guatemala City during 1994’95*.- En International Conference of AIDS.- 1996.
9. MEJIA, C., et al. –*Epidemiological characteristics and clinical outcome of 222 HIV/AIDS persons in Roosevelt Hospital in Guatemala City*.- En International Conference of AIDS.- 1996.
10. SAMAYOA, B. –*Impacto socioeconómico de la epidemia VIH/SIDA en Guatemala*.- En Revista Colegio de Médicos y Cirujanos de Guatemala.- Guatemala: 1995.
11. LABORATORIO DE TUBERCULOSIS, HGSD., *Manual de Diagnóstico de Micobacterias* (Traducción libre del ASM Clinical Microbiology Procedures Handbook (1998), con modificaciones y para fines docentes).- Guatemala: 2000
12. AMERICAN SOCIETY MICROBIOLOGY (ASM).- *Clinical Microbiology Procedures Handbook*.- USA: 1998.
13. VESTAL, A. –*Procedures for the isolation and identification of mycobacteria*.- USA: 1981.
14. WASHINGTON, J.A. –*Mycobacteria and Nocardia*.- En Laboratory Procedures in Clinical Microbiology. USA: 1981.
15. UCLA. –*Manual of Laboratory Methods in Medical Mycobacteriology*.- USA: 1986.
16. CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). –*Isolation and identification of Mycobacterium tuberculosis*.- USA: 1982.
17. FRIEDMAN, C.R. et al. –*Double-repetitive-element PCR method for subtyping Mycobacterium tuberculosis clinical isolates*.- En Journal of Clinical Microbiology . 1995.
18. SCHLUGER, N., AND ROM W. - *Current approaches to the diagnosis of active pulmonary tuberculosis*.- En American Journal Respiratory Critical Care.- USA:1994.
19. MERRICK, S., et al, - *Does induced sputum or bronchoscopy increase yield in the diagnosis of tuberculosis?*.- En Program and abstracts of the 9th International Conference of AIDS.- 1993.
20. GOOD, R., AND MASTRO T. -*The modern mycobacteriology laboratory. How it can help the clinician*.- En Clinical Chest Medicine.- USA:1989.

21. SLUTSKER, L., et al.- *Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis among persons with AIDS in the United States.*- En Clinical Infectious Diseases.- USA:1993.
22. ARATHOON, E., et al. - *Trends and patterns in HIV/AIDS epidemic in Guatemala City.* - En Abstract of the International Conference of AIDS. -1996.
23. PACHECO, A.G. et al. -*Tendencias da testagem anti-HIV entre pacientes com tuberculose no municipio do Rio de Janeiro.* En I Fórum e II Conferencia de Cooperacao Tecnica Horizontal da América Latina e do Caribe em HIV/Aids e DST. Brasil: 2000.

VIII. ANEXOS

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 PROGRAMA DOCENTE

ANEXO 2 EXAMEN DIAGNÓSTICO

ANEXO 3 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

ANEXO 4 INFORME DE CONSENTIMIENTO

ANEXO 5 ENTREVISTA

ANEXO 6 CRITERIOS DE ELIGIBILIDAD

ANEXO 1 PROGRAMA DOCENTE

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Programa de EDC
Sub-Programa Laboratorio Escuela

Diagnóstico de la infección por micobacterias e identificación de sus factores de riesgo en personas viviendo con VIH/SIDA a través de un programa de entrenamiento docente. Fase I.

Semana de entrenamiento a estudiantes de Química Biológica

Objetivos:

1. Implementar las técnicas de cultivo aislamiento e identificación de cepas de micobacterias en el programa -EDC- Escuela de Química Biológica/Hospital General San Juan de Dios.
2. Capacitar a estudiantes del programa -EDC- Laboratorio Escuela Hospital General San Juan de Dios, en las técnicas microbiológicas para micobacterias.
3. Determinar los factores de riesgo de las personas VIH/SIDA para desarrollar infecciones por micobacterias.
4. Procesar muestras, cultivar , aislar e identificar las micobacterias obtenidas de las muestras procesadas.

Programa de trabajo:

Día 1:

Clase teórica sobre generalidades y diagnóstico de micobacterias.

Proyección de video

Observación del procedimiento completo de digestión y decontaminación de muestras para baciloscopías y cultivo de micobacterias.

Tinción de Zielh-Neelsen a las muestras que se reciban en ese día.

Observación de baciloscopías.

Día 2:

Procesar las muestras que se reciban para el diagnóstico de micobacterias.

Tinción de Zielh-Neelsen.

Observación de baciloscopías.

Informar resultados.

Día 3:

Visita a la Clínica Familiar "Luis Angel García" y observación de la realización de una entrevista a un paciente del estudio.

Procesar las muestras que se reciban par el dignóstico de micobacterias.

Tinción de Zielh-Neelsen.

Observación de baciloscopías.

Informar resultados.

Día 4:

Procesar las muestras que se reciban par el dignóstico de micobacterias.

Tinción de Zielh-Neelsen.

Observación de baciloscopías.

Informar resultados.

Día 5:

Exámen Teórico

Procesar las muestras que se reciban par el dignóstico de micobacterias.

Tinción de Zielh-Neelsen.

Observación de baciloscopías.

Informar resultados

ANEXO 2 EXAMEN DIAGNÓSTICO

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
PROGRAMA DE EDC - LABORATORIO ESCUELA-

Nombre:

Carnet:

LABORATORIO DE DIAGNOSTICO DE MICOBACTERIAS

Conteste las siguientes preguntas en forma breve y específica. Use letra clara y legible.

1. ¿Cuál es el objetivo de la digestión y decontaminación de esputos.?
2. Describa el procedimiento de la tinción de Zielh-Neelsen para baciloscopías.
3. Describa la forma oficial de informar BARR de una baciloscopía.
4. ¿Cómo se llama el medio sólido a partir de huevo que se utiliza para el cultivo de micobacterias?
5. Describa el procedimiento para baciloscopía y cultivo de una muestra de líquido cefalorraquídeo.

ANEXO 3 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

En este anexo se describen las normas de bioseguridad y procedimientos de diagnóstico microbiológico empleadas durante este estudio.

1. Normas de Bioseguridad

1.1. Materiales Personales para Bioseguridad:

- Bata de trabajo, de cierre atrás, mangas largas y tela resistente y para uso exclusivo del trabajo con micobacterias.
- Guantes de látex, desechables.
- Mascarillas tipo 3M para micobacterias, desechables. Se pueden usar durante 1 mes.
- Anteojos protectores de plástico.
- NOTA: toda persona que trabaje muestras para el procesamiento de micobacterias, debe realizarse la prueba de PPD (tuberculina) y dependiendo de su resultado, debe realizarse una radiografía de tórax.
- La prueba de PPD debe repetirse cada 6 meses.

1.2. Condiciones y Equipo para bioseguridad:

- Laboratorio o espacio físico destinado únicamente para el trabajo de micobacterias.
- Campana de Flujo Laminar Tipo II.
- Lysol (desinfectante ambiental).
- Fenol al 5% (debe tenerse precaución en su utilización ya que es cancerígeno).
- Etanol al 70%.
- Bolsas plásticas de polipropileno, para autoclavar material contaminado.
- Papel mayordomo o servilletas.
- Film de parafina para sellar tubos (Parafilm).
- Centrífuga cerrada.
- Tubos de plástico de 50 ml con tapaderas.

1.3. Precauciones en el procesamiento de las muestras:

- La bata que se utiliza, debe permanecer en el área de micobacterias cuando se inicia o termina el trabajo.
- Para cualquier movimiento no relacionado con la manipulación de la muestra (ejemplo: abrir puertas, contestar teléfono, manipular libros, etc.), deben quitarse los guantes.
- Previo a iniciar el trabajo dentro de la campana, esta debe ser desinfectada de la siguiente manera: Encender la luz ultravioleta y el flujo de aire por 15 minutos, desinfectar la superficie interior de la campana con etanol al 70%, cubrir la superficie de trabajo con papel mayordomo u otro material absorbente, introducir a la campana, el equipo y material necesario para los procedimientos, permitir el

flujo de aire por 3 minutos antes de empezar a trabajar. Todos los procedimientos deben realizarse dentro de la campana con el flujo de aire encendido y la luz ultravioleta apagada.

- Al terminar las manipulaciones en el área contaminada, recoger el papel mayordomo o servilleta, colocarlo con todos los desechos y material contaminado, para autoclavarlos y luego tirarlos a la basura.
- Al utilizar la centrífuga, siempre utilizar tubos con tapadera y cerrados con parafilm. Esperar de 5 a 10 minutos al finalizar la centrifugación, para retirar los tubos. Esto con la intención de evitar aerosoles contaminantes.
- Mantener las puertas y ventanas cerradas durante el procesamiento. Prohibir el uso de ventiladores en esta área.
- Lavarse las manos con agua y jabón con frecuencia y secarse con toallas de papel.

1.4. Reutilización de láminas portaobjetos:

- Las láminas positivas nunca serán reutilizadas (autoclavar y eliminar, o guardar para colección y controles positivos).
- Las láminas negativas no rayadas pueden utilizarse para otros exámenes, recolectarlas en una bolsa separada, autoclavar y luego hervir durante 15 minutos en agua con jabón, lavarlas.

1.5. Medidas en Caso de Accidente:

En caso de derrame de una muestra en el piso o en la mesa, agregar fenol al 5%, cubrir con mayordomo o papel periódico empapado en fenol al 5% y dejar que actúe durante 30 minutos como mínimo antes de limpiar el área (usar guantes).

2. Procesamiento de muestras de cavidades abiertas (esputo, lavado bronquial, secreción orotraqueal, orina, etc.)

2.1. Preparación de frotos

Nota: Es recomendable preparar varios frotos de cada muestra (2 mínimo) para tener de reserva en caso de que ocurra algún problema en la tinción o para confirmar positivos conteniendo pocos bacilos.

2.1. Muestras concentradas o no concentradas

- a. Rotular un portaobjeto nuevo con el número correspondiente. Nota: limpiar los portaobjetos por inmersión en etanol previo a su uso.
- b. Agitar vigorosamente el sedimento en vortex de las muestras concentradas. Si es posible agitar vigorosamente (en vortex o agitador) las muestras que no hayan sido concentradas.
- c. Transferir una porción representativa de la muestra a la lámina utilizando un asa bacteriológica, un palillo o una pipeta. Para las muestras concentradas utilizar el

sedimento obtenido por el proceso de concentración. Para las muestras no concentradas, utilizar el material sanguinolento o necrótico cuando esté presente.

- d. Frotar la muestra en la lámina sobre un área de aproximadamente 1.5 x 1.5 cm. No colocar más de una muestra por lámina .
- e. Flamear el asa bacteriológica o descarte el palillo o la pipeta en un desinfectante adecuado y utilizar un/a nuevo para cada muestra.
- f. Permitir que el frote se seque al aire dentro de la campana.
- g. Fijar el frote de la siguiente forma: Pasar la lámina por el área azul de la llama de un mechero Bunsen tres o cuatro veces, evitando el sobrecalentamiento.

Nota: la fijación por calor puede que no mate todas las micobacterias, por lo tanto las láminas deben ser manejadas cuidadosamente y descartadas en un recipiente adecuado después de su observación.

2.2. Coloración de láminas

Tinción de Ziehl-Neelsen o Carbofuchsina en Caliente

Método del papel filtro

- a. Colocar una tira de papel filtro (aproximadamente 2 x 3 cm) en la lámina. (Esto minimizará la formación de cristales y ayudará a mantener el colorante en la lámina).
- b. Empapar la tira de papel con carbofuchsina de Ziehl-Neelsen.
- c. Calentar la lámina lentamente hasta que emita vapores.
- d. Permitir que el colorante permanezca por 5 min. Nota: Agregue más colorante pero no recaliente si la lámina comienza a secarse.
- e. Con una pinza, remover cuidadosamente la tira de papel de la lámina y descártela.
- f. Enjuagar la lámina con suficiente agua.
- g. Empapar la lámina con alcohol-ácido al 3%
- h. Permitir que el decolorante permanezca por 2 min.
- i. Enjuagar la lámina con suficiente agua. Drene el exceso de los extremos.
- j. Empapar la lámina con el colorante de contraste (azul de metileno)
- k. Permitir que el colorante de contraste permanezca por 1 min.
- l. Enjuagar con suficiente agua. Drene el exceso de agua de la lámina.
- m. Permitir que el frote se seque al aire.
- n. Examinar con objetivo de inmersión.

2.3. Informe de resultados de baciloscopías (Norma del Ministerio de Salud Pública. Laboratorio Central de Referencia de TB).

RESULTADO	INFORME
0-1 BAAR por campo, leyendo 100 campos	+
1-10 BAAR por campo, leyendo 50 campos	++
10 o más BAAR por campo, leyendo 20 campos	+++
No se encuentran BAAR en 100 campos	neg

2.4. Procedimiento de digestión y decontaminación de muestras para cultivo de micobacterias.

- Método con Hidróxido de sodio (NaOH) y N-acetil-L-cisteína (NALC)

- Agregar un volumen de la solución de trabajo de NALC-NaOH (de no más de 24 horas de preparación) igual al volumen de la muestra a un tubo de centrífuga con tapón de rosca. Si la muestra es de más de 10 ml, escoger 10 ml de la porción más purulenta, sanguinolenta o mucoide. Cierre bien el tubo.
- Agitar el tubo en vortex por no más de 30 segundos. Evitar la agitación excesiva, ya que NALC es inestable en presencia de oxígeno.
- Dejar reposar el tubo a temperatura ambiente por 15 minutos para decontaminar la muestra.
- Diluir la muestra a 45ml con agua desmineralizada estéril o buffer de fosfatos 0.067 M (pH 6.8)
- Volver a tapar el tubo e invertir varias veces para mezclar el contenido.
- Centrifugar a $\geq 3,000 \times g$ por 15 a 20 minutos.
- Descartar el sobrenadante en el recipiente de descarte y limpie la boca del tubo con fenol al 5%.
- Distribuir la muestra entre dos tubos de Lowenstein-Jensen, aproximadamente 0.5 ml en cada tubo
- Tapar y distribuir en toda la superficie del medio con ligera rotación
- Descartar el exceso de muestra en un recipiente a prueba de salpicaduras y con fenol al 5%
- Tapar dejando el tapón un poco flojo

- Poner en gradillas con slant e incube a 37°C por 48 horas

- LECTURA

- Primera lectura: a las 48 horas descartar contaminados y repórtelos.
- Parar los tubos en gradillas y dejar a 37°C
- Hacer lecturas cada semana durante 8 semanas.

2.4. Identificación de *Mycobacterium tuberculosis*

Se basa en la identificación presuntiva de las micobacterias mediante la observación de bacilos alcohol-ácido resistentes (BAAR) con la tinción de Ziehl-Neelsen, la velocidad de crecimiento y la producción de pigmento (14). Estas dos últimas características de crecimiento ubican a la micobacteria en los diferentes grupos de clasificación de Runyun (15). Este esquema de clasificación consiste en lo siguiente: micobacterias que tienen un pigmento fotoactivo (en presencia de luz) son Fotocromógenas o del Grupo I, si presentan pigmento en presencia o ausencia de luz son Escotocromógenas o del grupo II y si no tienen pigmento son No-fotocromógenas de los Grupos II o IV. A la vez si la micobacteria crece después de los 7 días de incubación se dice que es de crecimiento lento y puede ser del Grupo I, II ó III; si crece en menos de 7 días, es de crecimiento rápido o del Grupo IV (15).

La identificación confirmativa se basa en características bioquímicas de cada una de las especies de micobacterias. Una de las pruebas más importantes es la niacina, que se realiza para todas las cepas No-Fotocromógenas en cultivos de 3 ó 4 semanas de edad. *Mycobacterium tuberculosis* es positiva para la prueba de niacina, mientras que las otras micobacterias son niacina negativa (14-16).

2.4.1. Test de Niacina

A. Preparación de la muestra

1. Agregar 1.5 ml de solución salina estéril 0.85% o agua desmineralizada estéril a un cultivo de 3 – 4 semanas de edad, con al menos 50 a 100 colonias. Frotar una pipeta estéril sobre el crecimiento para permitir la extracción de la niacina. Las precauciones de esterilidad son innecesarias si los cultivos son descartados después de la prueba. No utilizar cultivos contaminados que muestren slants azules o blanqueados.
2. Inclinar los tubos de modo que la superficie del medio quede en posición horizontal y cubierta con el líquido. Permitir que permanezcan en esta posición por 20 – 30 minutos.

3. Cuidadosamente remover aproximadamente 0.6 ml del extracto con una pipeta estéril y transferirlo a un tubo de 13 x 75 mm.

B. Preparación de controles

1. Control negativo:

- Colocar 0.6 ml de la solución salina o agua desmineralizada estéril utilizada para la extracción de la niacina de los cultivos, en un tubo rotulado como control negativo.

2. Control positivo:

- Colocar 0.6 ml de agua desmineralizada estéril en un tubo de 13 x 75 mm, rotulado como control positivo.
- Agregar uno de los discos control de niacina, tapar y agitar moderadamente 3 veces durante 15 minutos. Dejar el tubo a temperatura ambiente.

C. Procedimiento

1. Procesar el cultivo como se indica en Preparación de la muestra y colocar 0.6 ml del extracto de cada muestra en tubos de 13 x 75 mm.
2. Mantener a mano los tubos control positivo y negativo.
3. Con pinzas flameadas, dejar caer una tira del test de niacina, con la flecha hacia abajo en cada uno de los tubos (control positivo, control negativo, muestra) y taparlos inmediatamente.
4. Mezclar gentilmente sin agitar. Repetir este movimiento después de 5 a 10 min.
5. Después de 12 a 15 min pero no más de 30 min, comparar el color de los extractos.
6. Autoclavear los tubos después de completar la prueba.

D. Resultados

Un resultado positivo para el test de niacina se evidencia por la aparición de color amarillo en el extracto de la muestra y en el control positivo y la ausencia de color en el control negativo.

E. Precauciones

Únicamente cultivos de 3 a 4 semanas de edad con al menos 50 a 100 colonias deben usarse en el test de producción de niacina. Una menor cantidad de colonias puede dar resultados negativos o dudosos.

No deben utilizarse cultivos contaminados.

Deben observarse las precauciones para el manejo de *Mycobacterium tuberculosis* al realizar esta prueba.

Los tubos tapados deben ser autoclaveados después de completar la prueba.

F. Limitaciones del procedimiento

Aunque un resultado fuertemente positivo para el test de niacina en micobacterias no cromogénicas, es altamente indicativo de *Mycobacterium tuberculosis*, se considera únicamente una identificación preliminar de este organismo. La identificación completa y final de *Mycobacterium tuberculosis* y otras micobacterias clínicamente significativas se basa en los resultados obtenidos en una batería de información que incluye test bioquímicos, patrones de susceptibilidad antibiótica, características morfológicas y análisis de ADN por la técnica de PCR.

2.4.2 Extracción de ADN de 51 cepas de micobacterias para realización de PCR (Polimerase Chain Reaction).

La Licda. Ana María Xet de la Universidad de Berkeley en California, realizó los PCR de 51 cepas de micobacterias, las cuales fueron preparadas de la siguiente manera para su traslado:

1. Lisis de las micobacterias

- Con un marcador permanente, rotular tubos de 1.5 ml con tapa de rosca estériles, con el número correspondiente de las cepas, tanto en el tubo como en la tapa.
- Poner 1 ml de agua estéril en cada tubo.
- En una campana de flujo laminar tipo II con adecuada protección de bioseguridad, transferir una colonia de *M. tuberculosis* con un palillo estéril del medio de cultivo Lowenstein-Jensen a cada tubo de microcentrifuga con agua destilada. Agitar el palillo para liberar a las bacterias en el agua. No olvidar el control negativo de la extracción.
- Cerrar muy bien las tapaderas.

- Hervir por 10 minutos a 100°C utilizando gradillas flotantes.
- Congelar las muestras a - 20°C.
- Descongelar y hervir las muestras por 10 minutos a 100°C en un baño de agua.
- Centrifugar los tubos por 5 minutos a 5,000 rpm en una microcentrifuga a temperatura ambiente.
- Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga estéril y almacenarlos a -20°C hasta su uso.

ANEXO 4 INFORME DE CONSENTIMIENTO

ANEXO 5 ENTREVISTA

ANEXO 6 CRITERIOS DE ELIGIBILIDAD

CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD **Proyecto Incidencia de TB en Pacientes Viviendo con VIH/SIDA**

ANTECEDENTES:

- Familiar con antecedentes de TB
- Conoce medicamentos para TB
- Encarcelados
- Hacinamiento

EXAMEN FÍSICO:

- Pérdida de peso
- Estertores
- Focalizaciones
- Hipoventilación

SÍGNOS Y SÍNTOMAS:

- Tos crónica
- Fiebre
- Hemoptisis
- Escalofríos
- Radiografía de tórax sugestiva de TB

BES-SAL febrero/2000

