

Detección de bacilos ácidos resistentes en muestras de esputo por el método de concentración con hipoclorito de sodio.

CEDEÑO RAIZA¹, MANEIRO EUNICE¹, ORELLAN YIDA¹, ALCALÁ BETITZA², GUEVARA ARMANDO²

¹Escuela de Ciencias de la Salud "Dr. Francisco Batistini". Universidad de Oriente. Núcleo Bolívar. Ciudad Bolívar.

²Unidad de Infectología y Microbiología Médica. Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez". Ciudad Bolívar.

E-mail: agvillefort@hotmail.com.

RESUMEN

El diagnóstico de la tuberculosis pulmonar se basa principalmente en la microscopía directa del esputo, la cual tiene baja sensibilidad. Para mejorar la sensibilidad de este método, se ha propuesto la concentración de los bacilos presentes en la muestra por centrifugación, previa fluidificación con diferentes sustancias. En esta investigación se comparó el resultado del procesamiento de muestras de esputo por el método directo y por el método de concentración utilizando hipoclorito de sodio al 5,25% (cloro de uso doméstico) como sustancia fluidificante. De 300 muestras procesadas por ambos métodos, 26 (8,67%) resultaron positivas por el método directo y 35 (11,67) por el método concentrado. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($\chi^2=1,48$; $p>0,05$). Se concluyó que el método de concentración con hipoclorito de sodio permite detectar casos de tuberculosis paucibacilar que pasan desapercibidos por el método directo. Aunque en este estudio, no hubo significancia estadística, el aumento observado en los casos positivos fue relevante desde el punto de vista clínico y epidemiológico.

PALABRAS CLAVES

Tuberculosis, NaOCl, hipoclorito de sodio.

ABSTRACT

The diagnosis of pulmonary tuberculosis is based on direct examination of sputum samples. This method has a low sensitivity. By improved the sensitivity, has been proposed the liquefaction with different substances and concentration by centrifugation. In this investigation were compared microscopy of smears made directly from sputum samples with microscopy after liquefaction of sputum with sodium hypochlorite at 5,25% (household bleach) and concentration of bacteria by centrifugation. A total of 300 samples of

sputum were studied by both methods; 26 samples (8,67%) were positive by direct method and 35 (11,67%) were positive by sodium hypochlorite method. There wasn't statistically significant improvement ($\chi^2=1,48$; $p>0,05$). However, it increase in the detection of positives cases was clinical and epidemiologically relevant. In conclusion, the sodium hypochlorite concentration method improved the detection of paucibacillary tuberculosis cases.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa producida por micobacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, que incluye a *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*. La infección se localiza generalmente en los pulmones pero puede afectar a cualquier órgano o sistema (Nava y Prieto, 2001; Jakowlew et al, 2002). El diagnóstico de la tuberculosis pulmonar en los países en desarrollo depende principalmente de la microscopía directa del esputo o baciloscopía, utilizando la técnica de coloración de Ziehl Neelsen, la cual es sencilla, rápida, económica pero con baja sensibilidad, que varía de acuerdo con la calidad de la muestra examinada y la cantidad de bacilos presentes en ella (Habeenzu et al, 1998; Nava y Prieto, 2001). En general, se considera que deben existir entre cinco mil y diez mil bacilos ácido resistentes por mililitro de expectoración para que exista un 50% de posibilidades de ser detectados al microscopio; sólo cuando el número de estos bacilos es superior a 10.000 por mililitro de expectoración, se espera que las baciloscopías sean consistentemente positivas (Nava y Prieto, 2001). Por lo tanto, a pesar de los esfuerzos por controlar esta patología, siempre existirán casos nuevos, ya que aquellos pacientes con tuberculosis pulmonar que presenten una baja tasa de eliminación de bacilos en su expectoración, es decir pacientes paucibacilares, no serán detectados por este método de diagnóstico y

podrían transmitir la enfermedad. Para aumentar la sensibilidad diagnóstica, se ha propuesto la concentración de los bacilos presentes en la muestra por centrifugación o sedimentación, previa licuefacción de la misma con diferentes sustancias como hidróxido de sodio, N-acetil-L-cisteína, quitina e hipoclorito de sodio (Farnia et al, 2002; Apers et al, 2003). Según Angeby et al (2004) éste método podría ser usado de rutina en aquellos países en vías de desarrollo en los cuales la pesquisa de casos de tuberculosis pulmonar se base en la baciloscopia directa del esputo y no en el cultivo e identificación de micobacterias, que es el patrón de referencia en cuanto al diagnóstico de tuberculosis se refiere. El objetivo de esta investigación fue comparar el resultado del procesamiento de muestras de esputo por el método directo y por el método de concentración utilizando hipoclorito de sodio al 5,25% (cloro de uso doméstico) como sustancia fluidificante, empleando la técnica de coloración de Zielh Neelsen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, descriptivo, experimental, donde se comparó el resultado de la baciloscopia de esputo al procesar las muestras por dos métodos diferentes: directo y por concentración con hipoclorito de sodio al 5,25% (NaOCl).

a.- Especímenes clínicos: Se procesaron un total de 300 muestras de esputo de reciente emisión, provenientes de pacientes sintomáticos respiratorios que acudieron a la Unidad de Infectología y Microbiología Médica del Complejo Hospitalario "Ruiz y Páez" en Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela, entre los meses de marzo y mayo de 2004.

b.- Procesamiento de las muestras por el método directo: A cada muestra se le determinó sus características macroscópicas, se tomó la partícula útil y se procedió a realizar un extendido y coloración de Zielh Neelsen según las Normas del Programa Nacional Integrado para el Control de la Tuberculosis (MSDS, 1998) (Figura 1).

c.- Procesamiento de las muestras por el método de concentración con NaOCl: A la porción restante de cada muestra se le agregó NaOCl al 5,25% (cloro de uso doméstico) en una proporción 1:1, se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente y se mezclaron manualmente en varias oportunidades durante ese tiempo. Luego las muestras tratadas fueron transferidas a tubos con tapa de rosca y centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. Posteriormente se dejaron reposar por 10 minutos, se descartó el sobrenadante, se resuspendió

el sedimento en el líquido remanente y se procedió a realizar extendidos mediante la colocación de una gota del sedimento en un portaobjetos limpio, los cuales fueron coloreados de la misma forma que en el método directo (Figura 1).

d.- Lectura e interpretación de los extendidos: Los extendidos procesados por los diferentes métodos y coloreados por la técnica de Zielh Neelsen se observaron al microscopio óptico con objetivo de inmersión (100x), determinándose la positividad, en los extendidos realizados por el método directo, de acuerdo a la Norma Oficial Venezolana del Programa Nacional Integrado para el Control de la Tuberculosis (MSDS, 1998). Los extendidos obtenidos al procesar las muestras por el método de concentración con NaOCl se reportaron como positivos sólo si se observaron bacilos ácidos resistentes sin importar su cantidad.

e.- Análisis estadístico: Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 8.0 para Windows® y los resultados fueron analizados mediante la aplicación de la prueba de Chi Cuadrado.

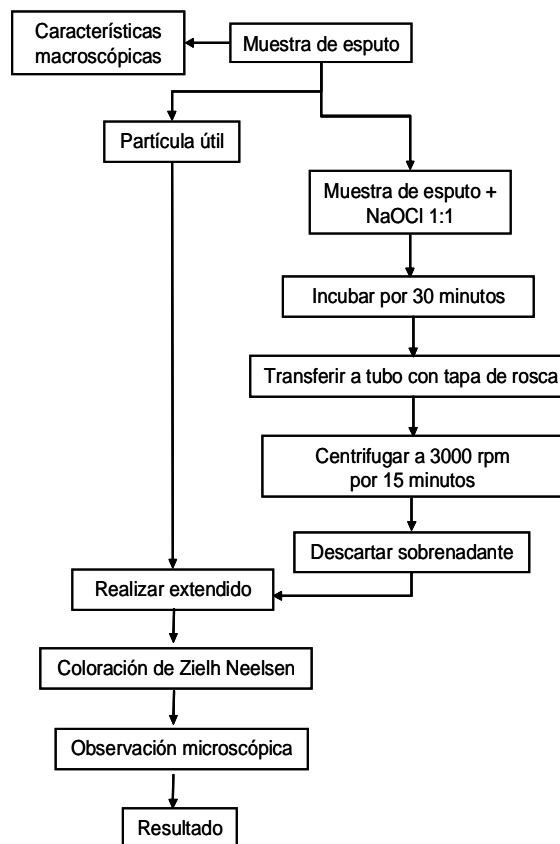


Figura 1. Representación esquemática de la metodología empleada

RESULTADOS

Se procesaron un total de 300 muestras de esputo de reciente emisión provenientes de pacientes sintomáticos respiratorios. El 49,33% (148) fueron mucopurulentas, 39% (117) mucosas, 6,67% (20) saliva y 5% (15) resultaron ser mucosanguinolentas (Gráfico 1). Al comparar el número de muestras positivas por ambos métodos de procesamiento, se pudo observar que en las procesadas por el método concentrado, 35 (11,67%) resultaron positivas, mientras que por el método directo se encontraron bacilos ácido resistentes en sólo 26 muestras (8,67%). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($\chi^2=1,48$; $p>0,05$). Cuando se evaluó la distribución de las muestras positivas según la calidad de las mismas, se encontró que para ambos métodos, las muestras mucopurulentas fueron las más productivas: 29 (9,67%) por el método concentrado y 21 (7%) por el método directo, seguidas por las mucosas con 4 (1,33%) por ambos métodos, mucosanguinolentas con 2 (0,66%) por el método concentrado y 1 (0,33%) por el directo mientras que no hubo muestras positivas cuando la muestra fue catalogada como saliva (Gráfico 2).

GRAFICO 1

Muestra de esputo procesadas según calidad de la muestra.

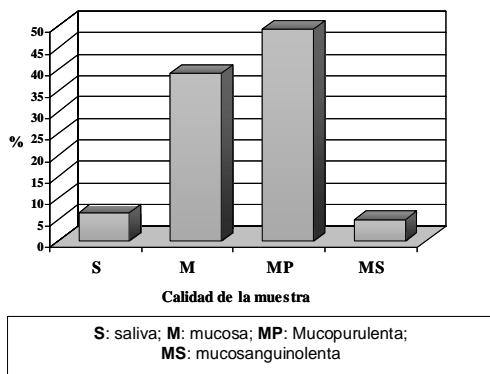
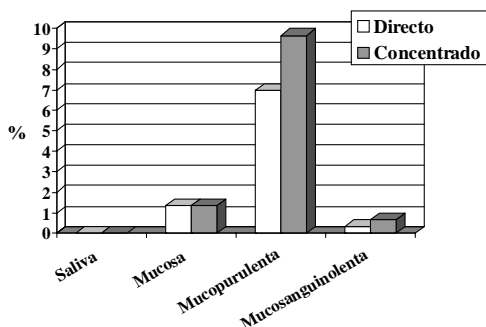


GRAFICO 2

Muestras positivas según calidad de la muestra y método de procesamiento empleado.



DISCUSIÓN

La tuberculosis sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, especialmente en los países en vías de desarrollo, por tal motivo existe la necesidad de mejorar el diagnóstico de los pacientes con esta patología a nivel pulmonar ya que ellos son los principales reservorios y diseminadores de la enfermedad (Nava y Prieto, 2001). El método más usado con este fin es la microscopía directa de las muestras de esputo, empleando la coloración de Ziehl Neelsen para detectar los bacilos ácido resistentes. Este método es rápido, económico y altamente específico, pero con una baja sensibilidad cuando se compara con los resultados de los cultivos para micobacterias (Aung et al, 2001), esto es debido principalmente a que los pacientes paucibacilares difícilmente son diagnosticados con ese método. Para mejorar la sensibilidad se ha sugerido someter las muestras a la acción de sustancias mucolíticas y posterior concentración de los bacilos por centrifugación, siendo la más usada el hipoclorito de sodio. (Angeby et al, 2000; Bruchfeld et al, 2000; Aung et al, 2001). En esta investigación se procesaron 300 muestras de esputo por el método directo y posteriormente se procesaron por el método concentrado utilizando NaOCl al 5,25% (cloro de uso doméstico) como agente mucolítico. Se encontró que el método concentrado fue más eficiente, aumentando la detección de bacilos ácido resistentes en 3%. Esto es consistente con un 4,7% de aumento en la detección reportado por Aung et al (2001) y 8,9% reportado por Bruchfeld (2000). Sin embargo, otros autores, en investigaciones realizadas en países africanos con alta prevalencia de tuberculosis pulmonar y en la India, reportan un aumento significativamente mayor, de 14,5% (Saxena et al, 2001), 32,9% (Habeenzu et al, 1998) y 29,5% (Gebre, 2003). Así mismo, Angeby et al (2004) hicieron un análisis comparativo de 19 estudios publicados en el ámbito mundial, donde se usó el método de concentración con hipoclorito de sodio, encontrando que en todos aumentó la sensibilidad de la detección de bacilos ácido resistentes en porcentajes que variaron entre 7 y 253% siendo este aumento estadísticamente significativo en 15 de ellos. En nuestra investigación, aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los métodos utilizados, el aumento porcentual de la detección de bacilos ácido resistentes fue importante desde el punto de vista clínico y de salud pública ya que se pudo administrar tratamiento precoz a 9 pacientes que no se diagnosticaron por el método directo y posiblemente se evitó que aproximadamente 180 personas se infectaran, si consideramos que cada enfermo no tratado es capaz de contagiar a 20 personas

sanas aproximadamente (Buescher, 1999). El uso de NaOCl al 5,25% como sustancia fluidificante tiene la ventaja adicional de que es económico y muy fácil de adquirir en el mercado, además de que es un potente desinfectante que mata a las micobacterias después de 5 minutos de exposición (Bello et al, 2004) por lo tanto se constituye por sí solo en una medida de bioseguridad muy efectiva al manipular las muestras que probablemente contienen micobacterias. Cuando se evaluó la calidad de las muestras y el resultado de la baciloscopia por ambos métodos se encontró que el mayor número de muestras positivas fueron las mucopurulentas, esto puede explicarse en parte porque este tipo de muestra fue la principalmente recibida (49,33%), pero también porque ésta es la muestra ideal ya que proviene del árbol bronquial y es representativa del sitio de infección (MSDS, 1998). En la literatura consultada no se encontraron referencias sobre la relación entre la calidad de la muestra y resultado de la baciloscopia.

En conclusión, el método de concentración con hipoclorito de sodio es económico, fácil de realizar y permite detectar casos de tuberculosis pulmonar paucibacilar que pasan desapercibidos por el método directo. Aunque en este estudio, no hubo significancia estadística, el aumento observado en los casos positivos fue relevante desde el punto de vista clínico y epidemiológico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angeby KA, Alvarado C, Pineda L, Hoffner S. 2000. **Improved sputum microscopy for a more sensitive diagnosis of pulmonary tuberculosis.** Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 4(7): 684-687.

Angeby KA, Hoffner SE, Diwan VK. 2004. **Should the "bleach microscopy method" be recommended for improved case detection of tuberculosis? Literature review and key person analysis.** Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 8(7): 806-815.

Apers L, Mutsvangwa J, Magwenzi J, Chigara N, Buteerworth A, Mason P, Van der Stuijt P. 2003. **A comparison of direct microscopy, the concentration method and the Mycobacteria Growth Indicator Tube for the examination of sputum for acid fast bacilli.** Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 7(4): 376-381.

Aung W, Nyein M, Ti T, Maung W. 2001. **Improved method of direct microscopy for detection of acid fast bacilli in sputum.** Southeast. Asian. J. Med. Public. Health. 32(2): 390-393.

Bello T, Bades M, de Waard J, Rivera I. 2004. **Actividad micobactericida de un grupo de desinfectantes utilizados en la clínica y el laboratorio.** Tesis de grado no publicada para optar al título de Licenciado en Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Bruchfeld J, Aderaye G, Palme, I, Bjorvant B, Kallenius G, Lindquist L. 2000. **Sputum concentration improves diagnosis of tuberculosis in a setting with a high prevalence of VIH.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94(6): 677-680.

Buescher E. 1999. **Tuberculosis.** [Serie en línea] Disponible en: <http://www.pediatricresearch.org/talks/tubercle/index.htm> (Marzo 2004).

Farnia P, Mohammadi F, Zarifi Z, Tabatabaee D, Ganavi J, Ghazisacedi K, Farnia P, Gheydi M, Bahadori M, Masjedi M Velayati A. 2002. **Improving sensitivity of direct microscopy for detection of acid-fast bacilli in sputum: use of chitin in mucus digestion.** J. Clin. Microbiol. 40(2):508-511

Gebre S. 2003. **Evaluation of the concentration sputum smear technique for the laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis.** Trop. Doct. 33(3): 160-162

Habeenzu C, Lubasi D, Fleming A. 1998. **Improved sensitivity of direct microscopy for detection of acid-fast bacilli in sputum in developing countries.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 92(4): 415-416.

Jakowlew A, Jacir A, y Navarro P. 2002. **Tuberculosis como enfermedad milenaria.** In Antibióticos e Infección: Infecciones Respiratorias. 1ª edición. Caracas: Editorial AFFCA. p 139-154.

Ministerio de Salud y Desarrollo Social, MSDS. Programa Nacional Integrado de Control de la Tuberculosis. 1998. **Norma oficial venezolana del Programa Nacional Integrado de Control de la Tuberculosis.** Caracas.

Nava O. y Prieto L. 2001. **Diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis pulmonar.** Kasmera. 29(1):51-63.

Saxena S, Mathur M, Talwar V. 2001. **Detection of tubercle bacilli in sputum: application of sodium hypochlorite concentration method.** J. Commun. Dis. 33(4): 241-244