

ARTÍCULOS ESPECIALES

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS "DR. CARLOS G. MALBRAN",
BUENOS AIRES
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Consideraciones sobre la implementación de nuevas herramientas diagnósticas en las redes de laboratorios de tuberculosis de Latinoamérica

Lic. Lucía Barrera¹ y Dr. Ernesto Montoro²

RESUMEN

Se analizó la factibilidad de utilizar métodos de diagnósticos rápidos que sean sustentables en Latinoamérica, los cuales brindan resultados oportunos y útiles para orientar el control clínico de pacientes con tuberculosis. La introducción de estos métodos en los laboratorios de los países en vías de desarrollo requiere una política racional que guíe la incorporación y aplicación de esta tecnología. En los últimos años, se han reportado sistemas automatizados para los cultivos y métodos moleculares para el diagnóstico de tuberculosis que han aportado precisión y rapidez. Sin embargo, su implementación está limitada porque dependen de costosos recursos, equipos e infraestructura de laboratorio. Recién se han desarrollado diferentes técnicas que han demostrado ser económicamente factibles de aplicar en laboratorios de escasos recursos. La detección de la enzima adenosina-desaminasa (ADA) en líquido pleural tiene un bajo costo y permite realizar el diagnóstico de tuberculosis. Por su parte, la detección microscópica de *Mycobacterium tuberculosis* mediante el método de agar en placa delgada tiene un costo moderado y constituye un método alternativo. El método de nitrato reductasa para la detección de resistencia a las drogas antituberculosas, acelera la obtención de resultados en los laboratorios que utilizan técnicas convencionales para el diagnóstico de tuberculosis.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico, resistencia, Latinoamérica.

En general, Latinoamérica tiene una situación intermedia entre la de regiones muy desarrolladas, con alta disponibilidad de recursos y baja incidencia de tuberculosis (TB), y la de aquellas que, con severa escasez de recursos, deben afrontar alta incidencia y carga de TB.

Es extensa la experiencia de la Región en la utilización de los métodos bacteriológicos convencionales un poco más complejos que la baciloscopia. Muchos países han demostrado que pueden afrontar el costo del cultivo convencional. La alta

disponibilidad de cultivo y las pruebas de sensibilidad, han posibilitado que el continente sea el de mayor cobertura con estudios que han evaluado el nivel de resistencia a drogas antituberculosas de primera línea.

Existen en el continente escenarios donde es altamente recomendable el progreso en la utilización de los métodos de laboratorio. En varios países con baja o mediana incidencia de casos, se presenta el desafío de extender la confirmación del diagnóstico de tuberculosis. En otros con alta

¹ Licenciada en Biología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr Carlos G. Malbran", Buenos Aires, Argentina.

² Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Titular. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

prevalencia o carga de TB multirresistente, la agilización del diagnóstico microbiológico sería muy conveniente para posibilitar la certera y rápida identificación de los casos que requieren esquemas terapéuticos reformulados.

Varios laboratorios de la Región tienen mucha potencialidad técnica y, como en todas partes del mundo, enfrentan la demanda natural de resultados oportunos y útiles para orientar el manejo clínico de pacientes que pueden estar afectados por TB incipiente, severa o complicada. En algunos ámbitos, es fuerte la promoción de productos de uso diagnóstico de la industria frente a una débil regulación para su aprobación y controles de calidad insuficientes o aún inexistentes. Son condiciones favorables para que se consienta el uso en la clínica de nuevos métodos, aun para aplicaciones que no han sido aprobadas en países industrializados.

En esta situación, se han introducido métodos de diagnóstico rápido de TB, en general, por decisiones espontáneas tomadas en los niveles intermedios de los sistemas de salud o, en ocasiones, inducidas por proyectos de investigación subsidiados con fondos de distinto origen. En algunos casos, la incorporación de métodos ha sido prudente, organizada, y ha producido buenos resultados. Pero en otros no se ha asegurado calidad, permanencia o utilización equitativa de tecnología que es sofisticada y cara en comparación con la convencional (o la utilización inmediata de resultados producidos con premura en el laboratorio). En la experiencia cotidiana se ofrecen ejemplos de que el esfuerzo financiero y técnico no siempre ha resultado en disminución de los tiempos en los cuales se toman decisiones clínicas o en la mayor precisión del diagnóstico.

Los equipos que conducen los programas de control de TB se han mostrado, en cierta medida, refractarios para considerar la inserción de métodos diferentes a la baciloscopia y para delinear y promover estrategias sobre el particular. Esta actitud, muchas veces, los ha separado de los especialistas ávidos de adelantos que pueden tener mucha influencia en el sistema de salud. Para fortalecer el liderazgo de los programas y, a la vez promover el mejor manejo de la TB en pacientes seropositivos al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), o que están afectados por bacilos resistentes a las drogas o tienen localización extrapulmonar de la enfermedad, se presenta el desafío de que el

nivel de referencia nacional de la red de laboratorios encabece, oriente, y encauce decididamente el proceso de satisfacción de la demanda del diagnóstico rápido, donde sea posible hacerlo con eficacia. El análisis de la evidencia producida en la Región puede contribuir a prevenir procesos anárquicos, mejorar la utilización de herramientas ya introducidas y guiar la racional incorporación y aplicación de nuevos métodos.

ANÁLISIS DE LA SITUACIÓN, IDENTIFICACIÓN DE LAS NECESIDADES Y RECURSOS DISPONIBLES

En primer lugar, es necesario considerar si es oportuno innovar. Ninguno de los métodos rápidos de diagnóstico desarrollados hasta el momento ha logrado reemplazar a los convencionales sino que los complementan. Más aún, la baciloscopia, el cultivo y las pruebas de sensibilidad convencionales continúan siendo los métodos de referencia con los que se deben evaluar y validar los nuevos. De manera que es premisa fundamental asegurar cobertura y calidad con los métodos bacteriológicos convencionales antes de introducir nuevas herramientas en la red de laboratorios.

En cada escenario, la selección de métodos debería estar guiada por la situación epidemiológica y la identificación de los grupos de pacientes prevalentes o numerosos para los que es técnicamente posible agilizar o mejorar el diagnóstico de laboratorio.

Luego, la selección está condicionada por los recursos disponibles o posibles de obtener, en forma regular y continua, para cubrir las prioridades en las que es aconsejable aplicar una nueva herramienta diagnóstica. Como se ha mencionado, en Latinoamérica ha sido posible mantener continuidad en la utilización de métodos bacteriológicos convencionales, pero ha sido difícil sostener métodos que dependen de infraestructura especial, equipos relativamente sofisticados, importación frecuente de reactivos y repuestos, y altos costos recurrentes. La experiencia aconseja enfocar la selección a métodos que utilizan equipos simples y reactivos que pueden ser preparados en los laboratorios. Se ha difundido el concepto de que estos métodos no alcanzan la calidad de los elaborados y estandarizados por la industria. Contradiciendo este argumento, se ha demostrado que es

posible alcanzar alta eficiencia con un método tan artesanal como el de las proporciones, en laboratorios que aplican procedimientos estandarizados. Tanto es así que se mantiene como método de referencia para determinar la resistencia a fármacos antituberculosos y es todavía el más utilizado en la Red Supranacional de Laboratorios de la Organización Mundial de la Salud.

Si se evalúa oportuna, conveniente y factible la incorporación de un nuevo método, la innovación debería ser inducida en laboratorios que hayan demostrado competencia para ejecutar los métodos bacteriológicos convencionales, aun los más complejos, y experiencia para interpretar resultados. Pero además, deben ser accesibles al sistema de salud, concentrar la investigación de los pacientes cuya asistencia se pretende mejorar, y tener asegurada la comunicación rápida con los médicos de asistencia que tratan a esos pacientes.

Se hace necesario definir un algoritmo para la aplicación e interpretación de resultados de cada método que se incorpore. Un examen costoso no debería ser solicitado si su resultado no va a ser tomado en cuenta para sostener o cambiar la conducta médica. Así, por ejemplo, si el cuadro clínico lleva a la administración de tratamiento, no tiene sentido realizar una prueba cara de laboratorio. Un resultado negativo no habilitará a retirar el tratamiento y uno positivo será intrascendente frente a la decisión ya tomada.

Sobre la base de la evidencia producida por los laboratorios de Latinoamérica en su rutina de trabajo, publicada o evidenciada en terreno, se considera a continuación la contribución potencial y la factibilidad de utilizar algunos métodos seleccionados entre los que han demostrado que aportan mayor precisión para el diagnóstico de TB, en forma más rápida que los métodos convencionales.

MÉTODOS TÉCNICAMENTE COMPLEJOS Y DE ALTO COSTO

Amplificación de ácidos nucleicos

El desarrollo y perfeccionamiento de la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction* [PCR]) ha ido seguida del diseño de nuevos sistemas de amplificación genética de segunda generación: *strand displacement amplification* (SDA), reacción en cadena de la ligasa

(*ligase chain reaction* [LCR]), Q-beta replicasa (QβRA), amplificación mediada por transcripción (transcription mediated by amplification [TMA]) y PCR en tiempo real (RT-PCR).

Se ha demostrado ampliamente que, aplicando procedimientos estrictos, la amplificación de ácidos nucleicos (AAN) puede ser utilizada para diagnosticar casos de TB a partir de muestras respiratorias (esputos, aspirados traqueales, lavados bronquioalveolares) de pacientes sintomáticos, sin antecedentes de TB. Produce resultados tan rápidos como una baciloscopia pero con mayor sensibilidad, de manera que permite detectar casos con baciloscopia negativa.

La probabilidad de detectar el bacilo por AAN depende de la cantidad de bacilos presentes en la muestra y no está muy afectada por las condiciones de su transporte. Es útil para confirmar o descartar muy rápido la presencia del bacilo de la TB en muestras en las que se observan microscópicamente bacilos ácido resistente que pueden ser micobacterias ambientales. Esto puede suceder, por ejemplo, en esputos de pacientes infectados por VIH con inmunosupresión avanzada que pueden estar padeciendo una micobacteriosis. La AAN puede resultar negativa en muestras con baciloscopia negativa y cultivo positivo, y en muestras de pacientes con diagnóstico clínico de tuberculosis. Por lo tanto, como sucede con todas las técnicas de laboratorio disponibles, no puede ser utilizada para descartar el diagnóstico de TB.

Es mucho más incierto el valor que tiene el método para diagnosticar TB pulmonar a partir de lavados gástricos. Según la evidencia creciente, la AAN alcanza a detectar un porcentaje menor de casos con TB extrapulmonar que pulmonar. Los organismos de regulación de países industrializados aún no han aprobado la aplicación de sistemas diagnósticos que amplifican ácidos nucleicos para investigar TB extrapulmonar.

El costo en equipamiento es moderado. La precisión del método es decididamente inaceptable si no se cuenta con personal muy entrenado, material descartable, equipamiento y estructuras adecuadas de los laboratorios. Para minimizar el riesgo de resultados falsos positivos, se requiere preparar los reactivos y amplificar el ADN en 3 áreas separadas, en lo posible independientes del laboratorio donde se procesan muestras para la investigación bacteriológica de TB, y respetar el

flujo unidireccional de trabajo. Además se debe utilizar solo material descartable protegido contra aerosoles. Aun con una técnica muy cuidadosa, el riesgo de producir resultados falsos positivos se incrementa cuando el laboratorio ha realizado numerosas ampliaciones del segmento de ADN que está investigando y cuando manipula muchas muestras que contienen bacilos. En las mejores condiciones de trabajo, se ha evidenciado que 2 a 5 % de los resultados positivos pueden ser falsos positivos. Por eso se ha recomendado confirmar estos mediante el procesamiento en otro día de una nueva muestra del paciente.¹

La AAN para detectar el bacilo de la TB puede ser realizada con sistemas preparados en los laboratorios que hacen diagnóstico o elaborados por la industria (Amplicor, MTD). Se comercializan también sistemas que aplican la AAN para identificar rápidamente, a partir de un cultivo positivo, las mutaciones más frecuentes del bacilo de la TB que lo hacen resistente a rifampicina, y para identificar otras micobacterias de interés clínico además de *Mycobacterium tuberculosis* (LIPA).

No parecen estar dadas las condiciones en la Región para difundir la aplicación de estos métodos moleculares al diagnóstico de TB, tal como fuera puesto en evidencia por algunos estudios multicéntricos realizados.²⁻⁴ Muy excepcionalmente se encuentran laboratorios de referencia de TB con estructura adecuada para realizar PCR con calidad. No se ha establecido el control externo de calidad de los métodos moleculares. No es aconsejable confiar el diagnóstico a laboratorios dedicados de manera exclusiva a la biología molecular que, aun con buenas condiciones para la AAN, no tengan muy sólida conexión con el laboratorio de referencia para la bacteriología de la TB. Es este laboratorio de referencia el que debe guiar el algoritmo de trabajo y de interpretación de los resultados y la complementación y validación de resultados con exámenes bacteriológicos. Por último, apenas se puede afrontar con continuidad el costo recurrente que impone la AAN con equipos de origen comercial.

Hibridación con sondas para la identificación de micobacterias

Se comercializan equipos que permiten identificar a partir de un cultivo, segmentos específicos de micobacterias de interés clínico, mediante la

hibridación con sondas (GenProbe) con mucha precisión, en un par de horas. Para obtener un resultado confiable, debe existir en el cultivo una cantidad abundante de micobacterias. No siempre es posible realizar la prueba a partir de frascos con cultivos positivos recién detectados por un equipo de lectura automatizada. Agiliza de manera significativa la identificación de algunas micobacterias ambientales que pueden estar causando enfermedad, por ejemplo en pacientes inmunocomprometidos por VIH, como las pertenecientes al complejo *M. avium intracellulare*. No es económicamente conveniente para la identificación de bacilos de la TB abundantes en un cultivo porque esto puede ser hecho, en pocas horas, mediante pruebas bioquímicas de bajo costo.

El procedimiento es sencillo, no tiene el riesgo de contaminación mencionado para la AAN. Entre los inconvenientes que presenta se encuentra la muy deficiente asistencia técnica con la que se cuenta en Latinoamérica para calibrar o reparar desperfectos del luminómetro, equipo necesario para revelar la prueba. Existen problemas de comercialización de los reactivos como son la falta de *stock* e importación de reactivos al borde del vencimiento. Estos problemas son más notorios cuando la importación es requerida por uno o unos pocos laboratorios del país y para un número muy limitado de determinaciones. Son altos los costos recurrentes cuando se le utiliza intensivamente.

Lectura automatizada de cultivos

En comparación con el método convencional, los sistemas que monitorean de forma automática botellas o tubos en donde se cultivan muestras de los pacientes, permiten disminuir a la mitad el tiempo necesario para detectar el desarrollo del bacilo. Estos medios de cultivo líquidos contienen algún sensor que cambia de color o emite fluorescencia cuando el bacilo consume O₂ o libera CO₂. Elaborados por la industria, son mucho más caros que los convencionales. Los sistemas más ofrecidos hoy día en Latinoamérica son el BACTEC 960, el MB/BacT Detección de Mycobacteria y el MycoBact/Alert. El primero utiliza el medio de cultivo MGIT (Tubo Indicador de Crecimiento de Mycobacteria) que también puede ser monitoreado de forma visual utilizando una lámpara de luz

ultravioleta. Por otro lado, el equipo BACTEC 460 que utiliza medios de cultivo con una fuente de carbono marcada radiactivamente, aun cuando ha demostrado ser de mucha utilidad, está en proceso de reemplazo por los inconvenientes que origina el empleo y desecho del material radioactivo.

Una vez mostrado el desarrollo del bacilo, los equipos BACTEC permiten detectar con precisión la resistencia a drogas antituberculosas, en la mayor parte de los casos, en el transcurso de una semana.

En algunos laboratorios de Latinoamérica ha sido posible instalar capacidad técnica para insertar estos equipos. Pero, a la vez, se han presentado desafíos económicos y operativos no siempre resueltos. El incremento considerable del costo del cultivo en relación con el convencional, restricciones presupuestarias no previstas y la comercialización ineficiente de insumos, han determinado la discontinuidad del uso de estos sistemas en varias instituciones. El problema de la comercialización se agrava en plazas que no son atractivas porque solo tienen uno o unos pocos equipos funcionando.

MÉTODOS MÁS SENCILLOS Y DE MENOR COSTO

Detección de adenosina-desaminasa (ADA) en el derrame pleural

La detección de ADA en el líquido pleural refleja la presencia, principalmente, de linfocitos T activados que producen la enzima. Un alto porcentaje de pacientes con TB pleural tiene niveles detectables de esta enzima.

Un valor elevado de ADA en una muestra de líquido pleural claro, con predominio de linfocitos, puede contribuir al diagnóstico de TB, si es posible descartar por los signos e imagen radiológica algunas otras enfermedades que también pueden estimular la producción de esta enzima como linfoma, enfermedad reumatoide y neoplasmas. Dado que la prueba no detecta ningún componente específico ni del bacilo ni de la respuesta inmune en TB, no puede ser utilizada sino como un complemento de los resultados de otros exámenes clínicos y bacteriológicos.⁵⁻⁷

Es posible detectar ADA en un par de horas con una técnica sencilla y económica desarrollada en 1965. Es necesario cuidar las condiciones de

toma, transporte y conservación de la muestra. La misma muestra utilizada para detectar la enzima puede ser cultivada. El valor de corte entre resultados positivos y negativos para ser aplicado al diagnóstico de TB puede variar entre 30 y 80 UI/mL y depende del método empleado para valorar la actividad enzimática, y la prevalencia relativa de TB entre otras enfermedades pleurales. De manera que debe ser establecido con un estudio previo donde la prueba vaya a ser utilizada.

Examen microscópico de cultivos en agar en capa delgada

Los métodos de descontaminación de las muestras menos agresivos para el bacilo de la TB, la mayor fuerza de centrifugación y la complementación de los medios sobre la base de huevos con otros sintéticos como los desarrollados por Middlebrook, permiten incrementar la confirmación bacteriológica del diagnóstico de TB por cultivo. Esta estrategia ha sido muy utilizada en los países desarrollados de América durante varias décadas. Recién fue demostrado en varios laboratorios de Latinoamérica que el agregado de placas que contenía una capa delgada de agar Middlebrook 7H11 examinadas con microscopio de manera periódica (2 veces/semana, durante 1 mes), permite reducir a la mitad el tiempo para detectar los cultivos positivos en relación con el que se demora con medio Löwenstein Jensen.⁸⁻¹⁰ Este método queda, entonces, en posición competitiva con la lectura automatizada de cultivos, en lo que a tiempo se refiere, con menor costo. Sin embargo, el medio Middlebrook 7H11 es más caro que el Löwenstein Jensen, especialmente por los suplementos de antibióticos y el enriquecimiento que requiere, por eso se propone utilizarlo en una capa delgada. Además, es más probable que se contamine y el examen de placas es laborioso, sobre todo, si se aplica para investigar un alto número de muestras. Debe ser combinado con el Löwenstein Jensen para incrementar la probabilidad de obtener cultivos positivos. Aun así, el agregado de la placa con medio 7H11, para sembrar en forma selectiva muestras de pacientes críticos, es una opción que merece ser considerada en los laboratorios de los países en desarrollo, sin recursos suficientes para incorporar equipos de lectura automatizada. En la tabla 1 se muestran los resul-

TABLA 1. Resultados obtenidos en Latinoamérica mediante el método de cultivos de agar en capa delgada

Autor, año	Muestras investigadas n	Muestras con cultivo positivo n	Sensibilidad % (*)		Tiempo requerido para detectar colonias días media ± DE	
			Middlebrook 7H11	Löwenstein Jensen	Middlebrook 7H11	Löwenstein Jensen
Mejia G <i>et al</i> , 1999	761	84 ^(a)	86,9	95,2	10,1 ± 8	20 ± 5,7
Robledo J <i>et al</i> , 2004	1 809	170 ^(b)	74,1	91,2	11 ± 4,9	26,5 ± 8,6
Robledo J <i>et al</i> , 2006	1 118	190 ^(c)	92,6	84,7	9,3 - 15	26,9 - 39 ^(d)

*: se toma como 100 % al total de cultivos positivos obtenidos con el medio Middlebrook 7H11 y el Löwenstein Jensen combinados; ^(a): todos identificados como *Mycobacterium tuberculosis*; ^(b): 86,4 % *Mycobacterium tuberculosis*, 13,6 % micobacterias ambientales; ^(c): 98,4 % *Mycobacterium tuberculosis*, 1,1 % micobacterias ambientales y 0,5 % *M. boris*; ^(d): IC 95 %.

tados obtenidos con la utilización del método de agar en capa delgada en Colombia y en un estudio multicéntrico realizado en Latinoamérica.

Indicadores de la viabilidad del bacilo para evaluar in vitro la actividad de isoniacida y rifampicina

En los últimos años se han diseñado técnicas relativamente rápidas, sencillas y de bajo costo que detectan la viabilidad del bacilo de la TB en un medio de cultivo que contiene antibióticos, sin necesidad de equipos especiales. Evaluados con el método de referencia, han demostrado que producen resultados muy precisos para evaluar *in vitro* la actividad de isoniacida y rifampicina, partiendo de un cultivo positivo. Como son más inciertos y menos reproducibles los resultados que se obtienen con etambutol y estreptomina, con cualquier método que se considere, no es aconsejable abordar innovaciones hasta que no se produzca evidencia que identifique el método más preciso para evaluar la actividad de estos 2 antibióticos.

Indicadores cromógenos: resazurina o MTT (bromuro de difeniltetrazolio)

El método permite determinar en 10 d la concentración inhibitoria mínima de cada antibiótico frente al aislamiento del bacilo obtenido a partir de una muestra del paciente. Se incorpora al medio de cultivo un indicador que es reducido por el bacilo si se ha mantenido vivo y cambia de color. Así, el desarrollo de bacilos resistentes, frente a cada concentración de antibiótico, es detectado por el cambio de color evidente a simple vista. Los indicadores más accesibles son resazurina y MTT.¹¹⁻¹⁴ Este método utiliza

medios de cultivo líquidos (Middlebrook 7H9), más caros que el Löwenstein Jensen y cuya manipulación eleva el riesgo biológico por producción de aerosoles. Se realizan diluciones en microplacas, con lo que también se incrementa el riesgo de errores de laboratorio por transferencia de bacilos entre distintos pocillos.

Fagos

Se ha demostrado que el empleo de fagos es muy útil para evaluar la actividad de rifampicina en la rutina de trabajo de un laboratorio de referencia.^{15,16} Puede ser realizado con un equipo producido por la industria o de manera simple con reactivos preparados en el laboratorio con muy bajo costo. Los bacilos aislados a partir de la muestra del paciente son expuestos a la acción de los antibióticos y luego a la de un virus bacteriófago. Solo los bacilos viables, resistentes a las drogas, permiten la infección por el virus y su replicación. La replicación del virus es detectada visualmente, en un segundo paso, cuando produce lisis sobre una superficie de crecimiento de micobacterias. El método produce resultados en 48 h y agiliza de manera sensible la identificación de pacientes con alto riesgo de falla de tratamiento con el esquema de primera línea.

Estos son métodos que usan indicadores cromógenos y fagos, son muy diferentes del método estándar de las proporciones utilizado por los laboratorios de Latinoamérica. Para implementarlos se requiere entrenamiento especial.

Actividad de la nitrato reductasa

La nitrato reductasa es una enzima que está presente en muchos microorganismos, entre los que

se encuentran el *Mycobacterium tuberculosis*. Su actividad es investigada de rutina como prueba de identificación de especies de micobacterias. Estudios recientes, realizados en Latinoamérica^{13,14,17-20} confirmaron experiencias de otras partes del mundo,²¹⁻²⁴ las cuales han demostrado que puede ser utilizada para detectar la viabilidad del bacilo de la TB expuesto a los fármacos antituberculosos y determinar, así, si es sensible o resistente a esas drogas.

Reiteradamente el método ha evidenciado muy alta precisión, igual a la del método de referencia, para investigar la actividad de isoniacida y rifampicina. Produce resultados en el término de 10 d a partir de un cultivo positivo, y en 14 d a partir de una muestra de esputo con baciloscopia positiva, en la mayor parte de los casos investigados. Se ubica, por lo tanto, en posición competitiva en relación con la lectura automatizada de cultivos con algunas ventajas que facilitan su incorporación en los laboratorios de Latinoamérica. Requiere reactivos y equipos habitualmente disponibles en los laboratorios de referencia de TB, emplea casi el mismo método que se utiliza para la prueba de sensibilidad por el método de las proporciones y utiliza medio sólido de Löwenstein Jensen que,

además de ser económico, no origina mayor riesgo de producción de aerosoles como los medios líquidos. Es, por lo tanto, una muy buena alternativa para acelerar la detección de multi-resistencia en laboratorios con experiencia en la ejecución del método de las proporciones en Löwenstein Jensen. En la tabla 2 se muestran las evaluaciones realizadas en Latinoamérica de la prueba de nitrato reductasa para investigar la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a drogas antituberculosas.

CONCLUSIÓN

Es necesario definir políticas que encaucen la aplicación de los recursos sofisticados existentes, guíen la inversión en nuevas herramientas diagnósticas y prevengan procesos anárquicos, no útiles o insostenibles en el tiempo en los servicios de laboratorio que son esenciales para el control de la tuberculosis. El análisis de la situación epidemiológica y de los recursos disponibles permite definir la oportunidad de introducir innovaciones y acotar las opciones dentro de un menú de pruebas que han demostrado ser precisas y ciertamente útiles para acelerar el diagnóstico.

TABLA 2. Evaluaciones realizadas en Latinoamérica de la prueba de nitrato reductasa para investigar la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a drogas antituberculosas

Autor, año	Aislamientos o muestras de esputo investigadas			Precisión del método de la nitrato reductasa en comparación con el de las proporciones					
	Total	Resistentes a R	H	Sensibilidad (%)	Rifampicina Especificidad (%)	Concordancia total de los resultados (%)	Sensibilidad (%)	Isoniacida Especificidad (%)	Concordancia total de los resultados (%)
Lemus D <i>et al.</i> , 2004	20	10	NE	100	100	100	NE	NE	NE
Montoro E <i>et al.</i> , 2005	100	37	45	100	100	100	95,5	100	98,0
Lemus D <i>et al.</i> , 2006	320	49	60	93,8	100	99,0	91,6	100	98,4
Martin A <i>et al.</i> , 2005									
Estudio multicéntrico en 5 laboratorios	30	15	12	86,6-100	100	98,0	91,7-100	94,4-100	96,6
Musa H <i>et al.</i> , 2005	121	11	13	100	100	100	92,3	100	99,1
Solis LA <i>et al.</i> , 2005	192	108	114	93,5	100	96,4	99,1	100	99,5

R: rifampicina, H: isoniacida, NE: no evaluado.

New diagnosis tools for tuberculosis laboratory network in Latin America

SUMMARY

Feasibility of rapid and sustainable diagnostic methods that provide useful and timely results to guide the clinical control of tuberculosis patients was analyzed. However, policies guiding the insertion of new diagnostics in the laboratory services that support the tuberculosis control are lacking in developing countries. The introduction of these methods in developing countries laboratories requires rational policies guiding the application of these technologies. In the last few years, some automated systems for culture and molecular testing in laboratory services for tuberculosis diagnosis, which offered accuracy and speed, have been reported. However, their implementation is restricted because of costly resources, logistics and infrastructure. Recently, various economically feasible tests have demonstrated to be applicable in poor-resource labs. The detection of adenosine desaminase (ADA) in pleural fluid is a valuable low-cost approach to the diagnosis of tuberculosis. On the other hand, the microscopic detection of *Mycobacterium tuberculosis* using thin layer agar is a moderate cost alternative method. Drug susceptibility testing to antituberculous drugs can be expedited by the nitrate reduction assay in tuberculosis laboratories using routine procedures for tuberculosis diagnosis.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, diagnosis, resistance, Latin America.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Centers for Disease Control. Update: Nucleic acid amplification test for tuberculosis MMWR 2000;49:593-4.
- Ridderhof JC, Williams LO, Legois S, Shult PA, Metchock B, Kubista LN, *et al.* Assessment of laboratory performance of nucleic acid amplification tests for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2003;41:5258-61.
- Suffys P, Palomino JC, Cardoso Leão S, Espitia C, Cataldi A, Alito A, *et al.* Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 2000;4:179-83.
- Cardoso Leão S, Bernardelli A, Cataldi A, Zumarraga M, Robledo J, Realpe T, *et al.* Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. J Microbiol Methods 2005;61:193-9.
- Salazar Lezama M, Quiroz Rosales H, Banales Méndez JL, Sánchez Guzmán M, Villarreal-Velarde H, Baez Saldana R, *et al.* Diagnostic methods of primary tuberculous pleural effusion in a region with high prevalence of tuberculosis. A study in Mexican population. Rev Invest Clin 1997;49:453-6.
- Lima DM, Colares KB, da Fonseca BA. Combined use of polymerase chain reaction and detection of adenosine deaminase activity on pleural fluid improves the rate of diagnosis of pleural tuberculosis. Chest 2003;124:909-14.
- Neves DD, Dias RM, da Cunha AJ, Preza PC. What is the probability of a patient presenting a pleural effusion due to tuberculosis? Braz J Infect Dis 2004;8:311-8.
- Mejia GI, Castrillon L, Trujillo H, Robledo JA. Microcolony detection in 7H11 thin layer is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 1999;3:138-42.
- Mejia GI, Guzmán A, Agudelo CA, Trujillo H, Robledo JA. Cinco años de experiencia con el uso de agar de capa delgada para el diagnóstico rápido de tuberculosis. Biomédica 2004;24(Suppl):52-9.
- Robledo JA, Mejía GI, Morcillo N, Chacón L, Camacho M, Luna J, *et al.* Evaluation of a rapid culture method for tuberculosis diagnosis: a Latin American multi-center study. Int J Tuberc Lung Dis 2006;10:613-9.
- Martín A, Morcillo N, Lemus D, Montoro E, da Silva Telles MA, Simboli N, *et al.* Multicenter study of MTT resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. Int J Tuberc Lung Dis 2005;9:901-6.
- Palomino JC, Martín A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2720-2.
- Lemus D, Martín A, Montoro E, Portaels F, Palomino JC. Rapid alternative methods for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother 2004;54:130-3.
- Montoro E, Lemus D, Echemendía M, Martín A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother 2005;55:500-5.
- Simboli N, Takiff H, McNerney R, López B, Martín A, Palomino JC, *et al.* In-house phage amplification assay is a sound alternative for detecting rifampin-resistant tuberculosis in low-resource settings. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:425-27.
- Yzquierdo SL, Lemus D, Echemendía M, Montoro E, McNerney R, Martín A, *et al.* Evaluation of phage assay for rapid phenotypic detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2006;5:11.
- Lemus D, Montoro E, Echemendía M, Martín A, Portaels F, Palomino JC. Nitrate reductase assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: simple and inexpensive method for low-resource laboratories. J Med Microbiol 2006;55:861-3.
- Martín A, Montoro E, Lemus D, Simboli N, Morcillo N, Velasco M, *et al.* Multicenter evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J Microbiol Methods 2005;63:145-50.
- Musa HR, Ambroggi M, Souto A, Ängeby KA. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a nitrate reductase assay applied directly on microscopy-positive sputum samples. J Clin Microbiol 2005;43:3159-61.
- Solis LA, Shin SS, Han LL, Llanos F, Stowell M, Sloutsky A. Validation of a rapid method for detection of *M. tuberculosis* resistance to isoniazid and rifampin in Lima, Peru. Int J Tuberc Lung Dis 2005;9:760-4.
- Ängeby K, Klintz L, Hoffner SE. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. J Clin Microbiol 2002;40:553-5.
- Syre H, Phyu S, Sandven P, Bjorvatn B, Grewal HM. Rapid colorimetric method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin in liquid cultures. J Clin Microbiol 2003;41:5173-7.
- Panaiotov S, Kantardjiev T. Nitrate reductase assay for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* J Clin Microbiol 2002;40:3881-2.
- Kumar M, Khan, IA, Verma V, Kalyan N, Qazi GN. Microplate nitrate reductase assay versus Alamar Blue assay for MIC determination of *Mycobacterium tuberculosis* Int J Tuberc Lung Dis 2005;9:939-41.

Recibido: 14 de abril de 2007. Aprobado: 21 de mayo de 2007.
Lic. Lucía Barrera. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos G. Malbran". Velez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina, Tel/Fax 011 43027635. Correo electrónico: lbarrera@anlis.gov.ar