

EVALUACIÓN DEL MEDIO MIDDLEBROOK 7H11 ASOCIADO A SANGRE HUMANA U OVINA PARA LA DETECCIÓN DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN MUESTRAS DE ESPUTO

Juan Agapito^{1,2,a}, Luis Cuadros^{1,b}, Sergio Tarrillo^{1,b}, Alonso Soto^{2,3,4,c}

RESUMEN

Objetivo. Evaluar el rendimiento diagnóstico del medio Middlebrook 7H11 combinado con sangre humana u ovina en comparación con el medio sólido Ogawa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. **Materiales y métodos.** Se evaluaron muestras de esputo provenientes de pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar. Las muestras fueron sembradas en agar Middlebrook 7H11 asociado a sangre humana u ovina y en medio Ogawa. **Resultados.** Se recolectaron un total de 130 muestras. La positividad para *M.tuberculosis* en Middlebrook 7H11/sangre humana, Middlebrook 7H11/sangre ovina y Ogawa fue de 45,38%, 46,15% y 43,84% respectivamente. El tiempo de crecimiento promedio del *Mycobacterium tuberculosis* fue de $12,81 \pm 6,52$, $13,07 \pm 6,63$ y $20,14 \pm 6,75$ días ($p < 0,01$ para la comparación de los medios basados en agar vs Ogawa). **Conclusiones.** La combinación de Middlebrook 7H11 con agar sangre u ovina presenta un rendimiento diagnóstico comparable y un tiempo de crecimiento menor que el medio sólido Ogawa.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*; Agar; sangre; Medios de cultivo; Diagnóstico (fuente: DeCS BIREME).

EVALUATION OF MIDDLEBROOK 7H11 ASSOCIATED WITH HUMAN OR SHEEP BLOOD FOR THE DETECTION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN SPUTUM SAMPLES

ABSTRACT

Objective. To evaluate the diagnostic yield of the media Middlebrook 7H11 combined with human or ovine blood in comparison with the Ogawa solid media for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Material and methods.** We evaluated sputum samples of patients with clinical suspicion of pulmonary tuberculosis. The samples were seeded in Middlebrook 7H11 agar associated with human or ovine blood and in Ogawa media. **Results.** A total of 130 samples were collected. The positivity for *M.tuberculosis* in Middlebrook 7H11/human blood, Middlebrook 7H11/sheep blood and Ogawa was 45.38%, 46.15% and 43.84% respectively. The mean times for growth for the *M. tuberculosis* were 12.81 ± 6.52 , 13.07 ± 6.63 and 20.14 ± 6.75 days ($p < 0,01$ for the comparison of agar based medium versus Ogawa). **Conclusions.** The combination of Middlebrook 7H11 with sheep or human blood has a comparable diagnostic yield but a shorter growth time than the Ogawa solid media.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; Agar; blood; Culture media; Diagnosis (source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

El Perú, un país con alta prevalencia de tuberculosis, tiene entre sus más graves debilidades el diagnóstico tardío y alto costo, particularmente en los casos de tuberculosis pulmonar con baciloscopia negativa en donde muchas veces depende de los resultados del cultivo, por lo cual el desarrollo de nuevas metodologías que permitan acortar los tiempos de crecimiento del *M.tuberculosis* constituyen una prioridad en salud pública. Contrariamente a la creencia habitual, se ha visto que muchas micobacterias pueden crecer en los medios

bacteriológicos comunes. Los requerimientos nutritivos de micobacterias son simples; por lo tanto, es posible su crecimiento en medios como el agar sangre o el agar chocolate ⁽¹⁾ y existen estudios que sugieren incluso la equivalencia o superioridad de dichos medios con relación a los medios sólidos convencionales en cuanto a rendimiento diagnóstico y tiempo de crecimiento ⁽²⁾.

El uso de medios basados en sangre para el diagnóstico de *M.tuberculosis* no es nuevo en la literatura científica. Es así que en 1915, Bezançon y Griffon recomendaban sangre de conejo con agar para obtener primeros

¹ Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.

² Asociación Latinoamericana de Biotecnología. Lima, Perú.

³ Hospital Nacional Hipólito Unanue. Lima, Perú.

⁴ Facultad de Medicina, Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú.

^a Biólogo; ^b Tecnólogo médico; ^c Médico Internista.

cultivos de lesiones causadas por esta bacteria ⁽³⁾. Y más recientemente Drancourt ha encontrado un mejor rendimiento diagnóstico del agar sangre con relación al medio sólido Lowenstein Jensen ⁽²⁾.

La combinación de medios de cultivo ha sido sugerida como una de las formas de incrementar el rendimiento diagnóstico de los medios de cultivo para *M.tuberculosis* y dentro de los medios disponibles para ello el Middlebrook 7H11 ha sido utilizado en estudio previos ⁽⁴⁻⁶⁾.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el rendimiento diagnóstico del medio Middlebrook 7H11 combinado con sangre humana u ovina en comparación con el medio sólido Ogawa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DE ESTUDIO

Se desarrolló una evaluación de prueba diagnóstica, la cual se llevó a cabo en el área de procesamiento de cultivos para *M. tuberculosis* del laboratorio del Hospital Nacional Cayetano Heredia en Lima, Perú. Se evaluaron muestras de esputo de personas sintomáticas respiratorias o con radiografía anormal de tórax en las cuales el médico tratante tuviera la sospecha clínica de tuberculosis pulmonar. Así mismo se realizaron cultivos en agar sangre ovina, humana y Ogawa. Cada una de las muestras fue sembrada por duplicado para cada uno de los medios. Se excluyeron a pacientes que ya estuvieran recibiendo terapia antituberculosa. El estudio tuvo la aprobación del Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

TAMAÑO MUESTRAL

Usando el software STATA versión 9.0, se calculó el tamaño muestral considerándose una sensibilidad de 0,95, un error alfa de 0,05 y una precisión de 0,04 obteniéndose un tamaño muestral de 114 pacientes.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y MEDIOS DE CULTIVO

Todo el procedimiento de las muestras se llevó a cabo en una cabina de Bioseguridad Tipo II-A (Labconco). El cultivo fue realizado en paralelo y cada muestra fue trabajada por duplicado, tanto en agar sangre ovina, agar sangre humana y en Ogawa. Previamente al cultivo, se realizó la coloración Ziehl Neelsen para obtener el resultado de baciloscopía.

Antes de proceder al cultivo todas las muestras fueron descontaminadas y homogeneizadas utilizando el método

de hidróxido de sodio - N - acetil-L-cisteina (NaOH-NALC), para ello se empleó hidróxido de sodio (NaOH) al 4 % más citrato de sodio al 2,9 %, como agentes decontaminantes y NALC (N-acetil-L-cisteina) 0,5 g por 100 mL de solución de NaOH/Citrato de sodio, como liquefactante del mucus y de fibrina. La utilidad de usar esta combinación es esencial para obtener un buen cultivo posterior, dado que se libera al bacilo del mucus, del material celular y del tejido en los que esta incluido. Todas las soluciones usadas en estos pasos fueron preparadas dentro de las 24 horas, para evitar posibles causas de contaminación. Por otro lado el número de muestras procesadas por día no excedió a más de diez.

La totalidad de las muestras descontaminadas, licuadas u homogeneizadas fueron sometidas a concentración, utilizando una centrifuga con porta-tubos. En un tubo de centrifuga de 50 mL se añadió la muestra colectada con un volumen igual de solución NALC/NaOH citrato de sodio (v/v) y se mezcló por inversión (± 5 a 10 segundos/tubo) para asegurar que la solución NALC/NaOH-citrato este en contacto con toda la muestra. Se dejó la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se completó con agua destilada estéril hasta un volumen de 50 mL, para nuevamente mezclar por inversión. Se concentró la muestra por centrifugación a 3 000 rpm durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el sedimento con 1 a 2 mL de agua destilada estéril.

A cada muestra se agregó 200 μ L de ampicilina a una concentración de 200 000 U / 50 mL de agua destilada estéril, con la finalidad de descontaminar la muestra de la flora acompañante, posteriormente 250 μ L. del sedimento fueron sembrados al medio de cultivo Ogawa, al agar sangre ovina y al agar sangre humana, tratando de cubrir toda la superficie del medio con la muestra y realizando este proceso para los tres medios. Se colocaron los tubos en una bandeja de metal de fondo inclinado y se incubó en estufa a 37 °C con las tapas semiabiertas. Después de 48 horas se revisaron los tubos y se ajustaron las tapas, además de verificar algún tipo de contaminación en los medios. Lecturas posteriores fueron realizadas a los 7, 14, 28, 30 y 60 días.

PREPARACIÓN DEL AGAR SANGRE OVINA Y AGAR SANGRE HUMANA.

Se utilizó base deshidratada de origen comercial (agar base Middlebrook 7H11) a pH 6,6 \pm 0,2. Su preparación fue de acuerdo a las instrucciones del fabricante: Se pesó 21 g de 7H11 para 900 mL de agua destilada, conteniendo 5 mL de glicerol. Se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121 °C a 15 libras de presión, posteriormente se retiró de la autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente

entre 50 - 55 °C. Luego se agregó asépticamente 100 mL de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) al mismo tiempo 50 mL de sangre humana u ovina, mezclando suavemente y evitando la formación de burbujas, se distribuyó rápidamente en tubos con tapa rosca (20 x 150 mm), cuidando rigurosamente la esterilidad. Cada tubo fue inclinado inmediatamente para que forme un pico de flauta. Los tubos fueron incubados por 24 horas a 37 °C para verificación de algún tipo de contaminación. Los tubos fueron conservados por tres semanas en cajas plásticas y refrigerados a 4 °C, hasta su posterior uso. No se preparó lotes de mayor tamaño porque el agar solidifica rápidamente, lo que dificulta las operaciones, por otro lado, no se fundió el medio por calor luego de solidificado porque este procedimiento disminuye su calidad.

PREPARACIÓN DEL MEDIO OGAWA

La preparación del medio Ogawa se realizó de acuerdo a las normas técnicas de los manuales de referencia del Instituto Nacional de Salud del Perú (INS) ⁽⁷⁾. Es importante considerar que una de las diferencias entre el uso de Ogawa con otros medios es la facilidad de sembrar la muestra con un corto proceso de descontaminación, asimismo, que no existe la necesidad de contar con una centrifuga, además, se ha realizado un corto proceso de neutralización de este medio a fin de tener una mayor probabilidad de casos positivos.

LECTURA DE LOS CULTIVOS

Las observaciones de los tubos fueron examinadas bajo una buena fuente de luz que permitió observar con claridad las características morfológicas típicas de las colonias de *M. tuberculosis*; que son de color crema, rugosa, con aspecto de coliflor; además se consideró

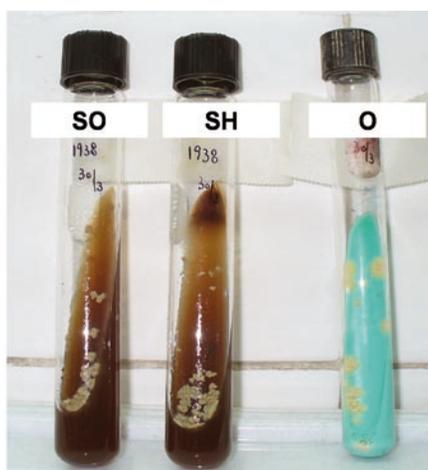


Figura 1. Morfología de *M. tuberculosis* en los tres medios de aislamiento: agar sangre ovina (SO), agar sangre humana (SH) y el medio Ogawa (O)

el porcentaje de contaminación, tiempo de crecimiento, número de colonias y tipo de crecimiento en cada cultivo, lo que fue registrado para su posterior análisis. La escala de medición se realizó por conteo de colonias según las normas técnicas establecidas por el INS ⁽⁷⁾.

De los cultivos que tuvieron crecimiento rápido, se realizó un extendido y una coloración de Ziehl Neelsen para verificar si son bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR). Los cultivos con ausencia de crecimiento de colonias permanecieron en control hasta los 60 días para considerarlo como cultivo negativo. Dado que los medios difieren claramente a simple vista (Figura 1) no fue posible realizar el enmascaramiento del tipo de medio de cultivo. Sin embargo, los cultivos procedentes del mismo paciente fueron rotulados con códigos distintos a fin de tener una evaluación independiente por parte del encargado de la lectura de los mismos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis descriptivo de las variables cuantitativas se muestran las medias y desviación estándar o medianas y rango intercuartílico en caso de distribuciones no normales. Para las variables categóricas se muestran las frecuencias absolutas y frecuencias relativas (porcentajes). Para la comparación de sensibilidad de los tres medios de cultivo se utilizó la prueba de chi cuadrado, considerando como estándar de referencia para el cálculo de la misma a la positividad en cualquiera de los tres medios. Para la comparación de los tiempos de crecimiento se utilizó la prueba de t de Students para muestras relacionadas. Debido a que se compararon primariamente los resultados de los dos grupos de agar Middlebrook 7H11 (asociado a sangre ovina o humana) con el Ogawa, se utilizó la corrección de Bonferroni para ajustar el valor de significancia, por lo cual se consideró un valor de $p < 0,017$ como estadísticamente significativo. Todos los procedimientos estadísticos incluyendo el cálculo del tamaño muestral fueron realizados utilizando el paquete estadístico STATA versión 8.2 ⁽⁸⁾.

RESULTADOS

Se incluyeron un total de 130 muestras de esputo. La mediana de edad de los pacientes fue de 66 años con un promedio de 44,97 años un mínimo de 13 y un máximo de 79 años. 52 muestras (40%) presentaron una baciloscopia positiva.

RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO

En el caso del agar sangre ovina, 60 (46,15 %) tuvieron cultivo positivo, sin diferencia estadísticamente significativa

Tabla 1. Comparación de aislamiento positivo de *M. tuberculosis* en los medios de cultivo Middlebrook 7H11/ sangre ovina vs humana

Middlebrook 7H11/ sangre ovina	Middlebrook 7H11/ sangre humana			Total
	Negativo	Positivo	Contaminado	
Negativo	68	0	1	69
Positivo	1	59	0	60
Contaminado	0	0	1	1
Total	69	59	2	130

Tabla 2. Comparación de aislamiento positivo de *Mycobacterium tuberculosis* en los medios Ogawa y Middlebrook 7H11/sangre ovina.

Medio Ogawa	Middlebrook 7H11/ sangre ovina			Total
	Negativo	Positivo	Contaminado	
Negativo	68	3	1	72
Positivo	0	57	0	57
Contaminado	1	0	0	1
Total	69	60	1	130

Tabla 3. Comparación de aislamiento positivo de *Mycobacterium tuberculosis* en los medios Ogawa y Middlebrook 7H11/sangre humana.

Medio Ogawa	Middlebrook 7H11/ sangre humana			Total
	Negativo	Positivo	Contaminado	
Negativo	68	2	2	72
Positivo	0	57	0	57
Contaminado	1	0	0	1
Total	69	59	2	130

Tabla 4. Tiempo de crecimiento en días: Middlebrook 7H11/sangre humana, Middlebrook 7H11/ sangre ovina y Ogawa.

Medio de cultivo	Tiempo de crecimiento (días)*	Minimo	Máximo	IC 95%
Middlebrook 7H11/ sangre ovina	13,07 ± 6,63	7	28	11,08 a 14,46
Middlebrook 7H11/ sangre humana	12,81 ± 6,52	7	28	10,99 a 14,31
Medio Ogawa	20,14 ± 6,75	14	42	18,35 a 21,93

* media ± desviación estándar.

con la positividad en agar sangre humana ($p=0,86$) u Ogawa ($p=0,59$) (Tablas 1 y 2). En 3 casos se obtuvo crecimiento en el medio agar sangre ovina pero no en el medio Ogawa (Tabla 2). La sensibilidad fue del 100%.

Fueron 59 las muestras con cultivo positivo en el caso de agar sangre humana, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa con el medio Ogawa ($p=0,72$), es preciso mencionar que 2 muestras fueron positivas en agar sangre humana pero negativas en Ogawa (Tabla 3). La sensibilidad encontrada fue del 98%.

Cuando se evaluó el medio Ogawa, se obtuvieron 57 muestras (43,84%) con cultivo positivo, 72 muestras (55,38%) resultaron ser cultivo negativo y una muestra (0,77%) presentó contaminación. No obstante, tres cultivos fueron negativos en Ogawa pero positivos en los medios agar sangre ovina o agar sangre humana. Todos los cultivos positivos en Ogawa también presentaron crecimientos en los medios basados en agar Middlebrook 7H11.

TIEMPO DE CRECIMIENTO

El tiempo promedio de crecimiento para *M. tuberculosis*, en los medio de sangre ovina, humana y Ogawa, fue de 13,07, 12,81 y 20,14 (Tabla 4), siendo significativamente inferior en los medios basados en agar ($p<0,001$ para la comparación de ambos medios versus Ogawa). No se encontró diferencia estadísticamente significativa para los tiempos de crecimiento entre ambos medios basados en agar ($p=0,65$).

DISCUSIÓN

Son muchas las metodologías descritas en la literatura en cuanto a la mejora de los métodos bacteriológicos de cultivo del *Mycobacterium tuberculosis*, de modo que se pueda disponer de sus resultados en corto tiempo. Las nuevas técnicas, particularmente los métodos radiométricos han acortado significativamente el tiempo para el diagnóstico, sin embargo, se requiere de una infraestructura e inversión que en Perú pocos centros pueden hacer, por lo que se sigue recurriendo a la baciloscopía y al cultivo en medios sólidos como el Ogawa o Lowenstein Jensen a nivel nacional ^(7,9).

Nosotros hemos evaluado la combinación del agar Middlebrook 7H11 asociado a sangre humana o de carnero para comparar su rendimiento diagnóstico y los tiempos de crecimiento para *M. tuberculosis* en muestras de esputo de pacientes con sospecha de tuberculosis utilizando como medio sólido de referencia al Ogawa. En cuanto al rendimiento diagnóstico, no encontramos diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, cabe resaltar que entre los pacientes con baciloscopías negativas, ocho presentaron cultivos positivos en el agar sangre mientras que sólo cinco presentaron crecimiento en Ogawa. Aunque la diferencia es no significativa, probablemente debido al pequeño tamaño muestral, estos datos sugerirían que en pacientes con tuberculosis frotis negativo el agar sangre podría tener una mayor sensibilidad que los medios de cultivo convencionales. Sería por tanto interesante realizar estudios en mayor escala para evaluar esta hipótesis considerando que los casos de tuberculosis con baciloscopía negativa

constituyen más de la mitad de los casos reportados a nivel nacional por la Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis ⁽⁹⁾.

En cuanto al tiempo de crecimiento, nuestro estudio demuestra que este es significativamente menor utilizando el agar Middlebrook 7H11 suplementado con sangre con sangre ovina o humana, requiriéndose alrededor de 7 días menos para el crecimiento de *M.tuberculosis*. Por otro lado, aunque no se cuantificó explícitamente, el número de colonias fue visiblemente mayor en los medios de Middlebrook 7H11 asociado a sangre ovina o humana lo cual facilita la lectura aun para personal con poco entrenamiento (Figura 1).

La disminución en los tiempos de crecimiento es concordante con lo encontrado por Drancourt utilizando agar sangre ⁽²⁾. El uso de medio basados en sangre esta incluso siendo actualmente evaluado para mejorar los tiempos de crecimiento en las pruebas de susceptibilidad ⁽¹⁰⁾. Debemos resaltar, sin embargo, que nuestro estudio ha utilizado la combinación de sangre con agar Middlebrook 7H11, lo cual no ha sido previamente reportado en la literatura médica y constituye el aporte fundamental de nuestro estudio.

El medio base middlebrook 7H11 ha sido utilizado previamente para el cultivo de *M. tuberculosis*, pero los resultados no han sido exitosos ⁽¹¹⁾. La implementación de lecturas microscópicas utilizando la metodología de placas en capa delgada utilizando este mismo medio parece tener mejores resultados ⁽¹²⁾. Sin embargo lo laborioso de la técnica y los requerimientos de bioseguridad hacen que su uso no haya sido difundido.

Dos aspectos que merecen un comentario final son las tasa de contaminación y el medio sólido de referencia utilizado. En cuanto a la contaminación, hemos encontrado tasas muy bajas posiblemente debido al pre-tratamiento de las muestras con ampicilina, lo cual podría ser una alternativa frente a combinaciones como el PANTA (polimixina B, anfotericina B, ácido nalidixico, trimetoprima y azlocilina), el cual suele elevar los costos de producción de los medios. Con respecto al medio sólido de comparación, si bien es cierto que el medio habitualmente utilizado es el Lowenstein Jensen, el medio Ogawa ha demostrado su equivalencia y es actualmente es utilizado en muchos laboratorios de referencia a nivel nacional.

En conclusión, la combinación del medio Middlebrook 7H11 con agar sangre ovina o humana presenta un rendimiento diagnóstico comparable al medio Ogawa para el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis*, requiriendo un tiempo de crecimiento significativamente menor. La evaluación de esta metodología a mayor escala, particularmente en pacientes con baciloscopia

negativa representa una interesante línea de investigación futura.

Fuente de Financiamiento

Autofinanciado.

Conflictos de Interés

Los investigadores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Broca TD. Biología de los microorganismos. 5ª Edición. Barcelona: Ed. Omega; 1977.
2. Drancourt M, Carrieri P, Gevaudan MJ, Raoult D. Blood agar and *Mycobacterium tuberculosis*: the end of a dogma. J Clin Microbiol. 2003; 41(4): 1710-11.
3. Bezanc, on F, Griffon V. Culture du bacille tuberculeux sur la pome de terre emprisonnée dans la gélose glycéinée et sur le sang gélosé. C R Soc Biol. 1903; 51(1):77-79.
4. Adler H, Straub C, Frei R. Comparison of BacT/ALERT 3D, Lowenstein-Jensen médium and Middlebrook 7H10/7H11 biplate for recovering mycobacteria from clinical specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005; 24(7): 499-500.
5. Stager CE, Libonati JP, Siddiqi SH, Davis JR, Hooper NM, Baker JF, et al. Role of solid media when used in conjunction with the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification. J Clin Microbiol. 1991; 29(1): 154-57.
6. Ghatole M, Sable C, Kamale P, Kandle S, Jahagirdar V, Yemul V. Evaluation of biphasic culture system for mycobacterial isolation from the sputum of patients with pulmonary tuberculosis. Indian J Med Microbiol. 2005; 23(2): 111-13.
7. Instituto Nacional de Salud. El laboratorio de salud pública frente a la emergencia de la tuberculosis resistente. Lima: INS; 2001.
8. StataCorp. Stata statistical software: release 8.2. College Station, TX: StataCorp LP, 2004.
9. Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis. Situación de la tuberculosis en el Perú. Informe de Gestión 2008. Lima: Ministerio de Salud; 2008.
10. Coban AY, Bilgin K, Uzun M, Akgunes A, Yusof A, Durupinar B. Comparative study for determination of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to first- and second-line antituberculosis drugs by the Etest using 7H11, blood, and chocolate agar. J Clin Microbiol. 2008; 46(12): 4095-98.
11. Idigoras P, Beristain X, Iturzaeta A, Vicente D, Pérez-Trallero E. Comparison of the automated nonradiometric Bactec MGIT 960 system with Löwenstein-Jensen, Coletso, and Middlebrook 7H11 solid media for recovery of mycobacteria. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19(5): 350-54.
12. Mejia GI, Castrillon L, Trujillo H, Robledo JA. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection Int J Tuberc Lung Dis. 1999; 3(2): 138-42.

Correspondencia: Juan Agapito.

Dirección: Av. Honorio Delgado N° 430 Urb. Ingeniería - San Martín de Porres, Lima, Perú.

Teléfono: (511) 9989-79734.

Correo electrónico jucar_ap@yahoo.com