

462ei



Universidad Nacional Autónoma de México

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS ENTRE PACIENTES DIAGNOSTICADOS POR BACIOSCOPIAS EN EL LABORATORIO CLINICO DEL HGZ/MF-58 DEL I.M.S.S. TLALNEPANTLA, EDO. DE MEXICO.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A

MARIA AUXILIO RUELAS RAMOS

Director: Q. F. I. Andrea A. Becarril Osnaya



V N A M

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS: | 5 |
| 1.0 RESUMEN: | 6 |
| 2.0 INTRODUCCION: | 8 |
| 2.1 MICOBACTERIA: | |
| 2.1.1 Generalidades: | 10 |
| 2.1.2 Características taxonómicas: | 10 |
| 2.1.3 Composición química: | 11 |
| 2.1.4 Crecimiento: | 14 |
| 2.2 TUBERCULOSIS: | |
| 2.2.1 Transmisión: | 15 |
| 2.2.2 Infección y enfermedad: | 16 |
| 2.2.3 Patogenia: | 16 |
| 2.2.4 Programa de Prevención y Control: | 17 |
| 2.3 METODOS DE DIAGNOSTICO: | 21 |
| 3.0 OBJETIVOS: | 23 |
| 4.0 MATERIAL Y METODOS: | |
| 4.1 Materiales | 24 |
| 4.2 Diagrama de flujo: | 29 |
| 4.3 Metodología: | 32 |
| 5.0 RESULTADOS: | 42 |
| 6.0 DISCUSION: | 62 |
| 7.0 CONCLUSIONES: | 70 |
| 8.0 BIBLIOGRAFIA: | 71 |
| 9.0 APENDICE: | 76 |

ABREVIATURAS UTILIZADAS

| | | |
|-----------|---|---|
| Tb | = | Tuberculosis |
| MD | = | Método de frotis Directo |
| MCD | = | Método por Concentración-Descontaminación. |
| HGZ/MF-58 | = | Hospital General de Zona con Medicina Familiar # 58 "Las Margaritas" del I.M.S.S. |
| BCG | = | Bacilo Calmette Guerin |
| BAAR | = | Bacilo Acido Alcohol Resistente |
| Z-N | = | Tinción de Ziehl-Neelsen |
| L-J | = | Medio de cultivo Lowenstein-Jensen |

1.0 RESUMEN.

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa considerada como problema relevante de salud pública en nuestro país, que contrasta con la existencia de elementos médicos y técnicos, de diagnóstico, tratamiento y prevención.

Se estima que 12,000 nuevos enfermos tuberculosos se diagnostican anualmente en los servicios de la Secretaría de Salud. La confirmación diagnóstica se establece por la baciloscopia.

En este trabajo se efectuó el estudio comparativo del examen baciloscópico para obtener frotis positivos con y sin descontaminación de la muestra (método directo-MD, y método por concentración y descontaminación-MCD) mediante una muestra representativa de 897 muestras clínicas.

Se obtuvieron substancialmente mejores resultados cuando la muestra fué procesada y concentrada, por lo que se señala que el MCD provee una mejor confiabilidad en el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis.

Con la finalidad de conocer las características epidemiológicas de la Tb en el área del HGZ/MF-58 del IMSS, localizada en el Estado de México, se analizaron los datos de prevalencia del periodo 1985-1989. Los resultados indicaron que la frecuencia de Tb en promedio se mantiene sin cambios en este periodo.

Estos análisis plantean la realidad y problemática de la enfermedad en México, que si bien se cuenta con una disminución significativa de las tasas de mortalidad, la Tb continúa siendo un problema tanto de salud personal como de salud pública.

2.0 I N T R O D U C C I O N .

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo de la tuberculosis en los mamíferos: Mycobacterium tuberculosis. La tuberculosis es endémica con tendencia natural a la disminución lentamente progresiva, pero en la actualidad ocupa un lugar importante en problemas de salud pública en nuestro país. (37)

La enfermedad se encuentra en todo el mundo pero está particularmente difundida en los países en desarrollo en los cuales la población total se estima en más de 2000 millones de personas. (36) En el noveno informe del Comité de Expertos de la OMS en Tuberculosis se declaró que en algunas regiones de Africa, Asia y Oceanía, la incidencia anual declarada de la tuberculosis pulmonar es de 250-300 casos por 100,000 habitantes y la prevalencia suele ser de por lo menos dos veces mayor. En la actualidad se calcula que existen en el mundo de 15 a 20 millones de casos contagiosos de tuberculosis. (11)

En México es mejor conocida la mortalidad que la morbilidad por la notificación deficiente de los casos nuevos. Para 1985 la tasa de mortalidad debida a tuberculosis en todas sus formas fue de 8.7 defunciones por cada 100,000 habitantes. En ese año la tuberculosis ocupó el 14° lugar dentro de la clasificación general de causas de muerte en la República

Mexicana, a expensas de una alta participación de la tuberculosis pulmonar, que en ese año alcanzó una tasa de 7.6 por 100,000 habitantes. (16)

La tuberculosis pulmonar representa el 88% de las muertes por este padecimiento y le siguen en importancia la localización de tuberculosis de las meninges y del sistema nervioso central con 5.4%. (37)

La incidencia de casos nuevos en el período de 1982 a 1985 se redujo un 22.4% que corresponde a 5.6% como promedio anual (esta cifra corresponde a lo notificado). Es conveniente aclarar que existe un 30% aproximado de casos que no se diagnostican. En 1987 la tasa de morbilidad por tuberculosis pulmonar fué de 15.9 por 100,000 habitantes. (36)

2.1 MICOBACTERIA

2.1.1 Generalidades.

Las micobacterias comprenden un amplio grupo de bacilos acidófilos, alcoholófilos, aerobios o microaerofílicos, no esporulados y no móviles de tamaño de 2 a 4 μ m. de largo y de 0.2 a 0.6 μ m de ancho. Pueden ser parásitos obligados saprófitos, formas intermedias que son comunmente saprófitos pero con patogenicidad potencial. (21)

El M. tuberculosis es un microorganismo específico de la especie humana, se transmite por vía aérea y los infectados que llegan a desarrollar una enfermedad tuberculosa pulmonar, se convierten en las fuentes de infección. (44)

Es un bacilo facultativo aerobio intracelular que requiere presiones parciales de oxígeno entre 120-140 mmHg., temperatura ambiente de 37°C, pH neutro, nutrientes, humedad moderada y obscuridad. (44) No produce toxinas conocidas y su virulencia se relaciona con su capacidad para sobrevivir y proliferar en los fagocitos mononucleares. (39)

2.1.2 Características taxonómicas.

Las micobacterias se clasifican entre los Actinomicetos y microorganismos afines; Orden I, Actinomycetales; Familia II, Mycobacteriaceae; Género I, Mycobacterium. La taxonomía de las

micobacterias está siempre en movimiento, se tiene análisis detallado de miles de cepas micobacterianas por lo que especies bien definidas se reconocen y aceptan internacionalmente dentro de los 4 grupos de Runyon: fotocromógenos, escotocromógenos, no fotocromógenos, y crecimiento rápido.

Es de uso común el nombre de complejos de especies para designar grupos de organismos de potencial patógeno: complejo TB (M. tuberculosis-bovis-africanum), complejo MAIS (M. avium-intracellulare-scröfulaceum), complejo Fortuitum (M. fortuitum-chelonae). (8, 21)

Tiene interés taxonómico el estudio de la composición de los ácidos nucleicos. Así el método confiable de identificación podría ser a nivel de DNA. Actualmente es factible caracterizar cepas a nivel de genoma utilizando técnicas de extracción de DNA micobacterial. (32)

2.1.3 Composición química.

La composición química de las micobacterias está constituida por lípidos, proteínas y polisacáridos. Su alto contenido en lípidos relacionados con la estructura de la pared celular, de hasta un 40 por ciento del peso seco de la célula, explican algunas de sus características celulares: hidrofobia, relativa impermeabilidad para los colorantes, lentitud de

crecimiento por dificultad en el paso de sustancias nutritivas, resistencia a la acción de los ácidos y álcalis., a los anticuerpos y complemento. (2, 19)

Los polisacáridos se encuentran en la pared celular; las proteínas en pared celular y citoplasma; los lípidos en citoplasma pero predominantemente en la pared celular. La fragmentación química de extractos de cultivos de bacilos tuberculosos describieron cuatro proteínas A, B, C, D, y dos polisacáridos, I y II. Estudios posteriores identificaron la naturaleza bioquímica. Las proteínas son mezclas polisacáridos-proteína denominadas ahora como Antígenos 1, 2, 4, 5, 6, 7. Sus propiedades son: desarrollo de la Hipersensibilidad Tardía, inhibición de macrófagos y como inmunógeno.

Los polisacáridos I y II están compuestos por arabinogalactanas, arabinomananas, mananas y glucanas. (18, 20)

Lípidos micobacteriales:

En los lípidos se encuentran sustancias predominantemente inmunoreactivas: Ácidos micólicos, Fosfolípidos, Cera D. Glucolípidos. El papel de los lípidos micobacteriales puede ser el de toxicidad al huésped o inmunoreactividad. (19)

Ácidos micólicos:

Son ácidos grasos α -alquil, β -hidroxil que se encuentran formando parte de la pared celular y como constituyentes en otros lípidos, como en la cera D y glicolípidos. Su naturaleza y localización son responsables de las reacciones de tinción ácido-resistente. (19)

Fosfolípidos:

El fosfatidilinositol monósido (PIM) y oligomanósidos, son sustancias cementantes para el esqueleto de la pared celular. La cardiolipina, fosfolípido de la membrana celular, y el PIM poseen potencial serodiagnóstico. (20)

Cera D:

Es un péptido-glicolípido compuesto por micolilarabinogalactana enlazado por un fosfodiéster y péptidos a ácido murámico. La cera D tiene actividad adyuvante que reside en el componente Dipéptido Muramil. (20)

Glucolípidos:

Incluyen el Factor Cerdón (trealosa-6,6'-dimicolato) y los Sulfátidos, (trealosa-2-sulfato).

Cepas virulentas de M.tuberculosis tienen la habilidad de formar cordones en serpentinas de bacilos en arreglos paralelos estrechos. (14, 19)

Al Factor Cerdón y a los Sulfátidos se les atribuye las siguientes actividades biológicas:

El Factor Cordón induce la formación de granulomas, secundario a la quimiotaxis y estimulación de macrófagos, activa la vía alterna del complemento y provoca un proceso inflamatorio agudo. (20)

Los sulfátidos se consideran factores de virulencia "genuinos". Son lisosomotropicos para los macrófagos y antagonizan la fusión de lisosoma con fagosomas. Conforme aumenta la población bacilar, se producirá más Factor Cordón y Sulfátidos, lo que causará más destrucción de tejidos. (18)

Un tercer lipido, el tioceroil dimicocerosato, parece estar asociado fenotípicamente con el estado virulento. (34)

2.1.4 Crecimiento.

El bacilo tuberculoso requiere como elementos fundamentales para su nutrición: carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno., y en segundo término, fósforo, potasio, magnesio y fierro. (1)

Para su aislamiento se necesitan medios de cultivo enriquecidos que contienen huevos enteros, harina de papa, glicerol, y sales. (38)

En estos medios, la fuente de carbono es casi siempre el glicerol o en su defecto la glucosa; la fuente de nitrógeno es la asparagina, las sales de amonio o los aminoácidos. El oxígeno y el hidrógeno lo toma del medio atmosférico, ya que el bacilo es un aerobio que se desarrolla en superficie. (19)

Los colorantes de anilina como el verde malaquita en el medio coagulado, se utiliza para inhibir las bacterias contaminantes. (38)

El medio base de huevo de Lowenstein-Jensen es el comunmente usado para el cultivo primario, identificación y pruebas de sensibilidad. (3) Medios de cultivo L-J y Middle brook 7H10 y 7H11 modificados, contienen diversos agentes antimicrobianos con la misma finalidad, como: penicilina, ácido nalidixico, ciclohexamida, lincomicina, carbenicilina, anfotericina B, lactato de trimetropina, Polimixina B. (27)

Para su desarrollo "in vitro" las micobacterias requieren de temperatura adecuada, según la especie, entre 25 y 45°C el crecimiento puede ser rápido, lento o muy lento. (2) Desarrollan mejor en una atmósfera con menor tensión de oxígeno y tensión mayor de CO_2 . (1)

2.2 TUBERCULOSIS:

2.2.1 Transmisión.

La tuberculosis se transmite primariamente por gotas en el aire; la infección ocurre cuando personas susceptibles inhalan gotas infectadas producidas por las exhalaciones de personas con enfermedad tuberculosa pulmonar. El riesgo de infección está directamente relacionado a la duración e intensidad de la exposición al aire contaminado con estas gotas. (10)

2.2.2 Infección y enfermedad.

Se debe distinguir entre la infección de tuberculosis y la enfermedad. La infección de Tb, diagnosticada generalmente por la positividad de una prueba cutánea de tuberculina, existe si los bacilos tuberculosos residen en el cuerpo pero no hay síntomas, ni evidencia radiográfica de Tb, y si se hacen estudios bacteriológicos resultan negativos. (23)

Por otra parte, la Tb confirmada por estudios bacteriológicos y otros estudios, es un proceso de enfermedad en una persona infectada involucrando uno o más sistemas orgánicos. Sólo 5-15% de los infectados desarrollan la enfermedad. Las infecciones se transforman más en enfermedades clínicas con presencia de factores de riesgo, incluyendo edades mayores y menores, infección en los dos últimos años, desnutrición, y supresión de la inmunidad celular. (22)

2.2.3 Patogenia.

La infección primaria es asintomática; pequeñas gotas inhaladas de 1 a 5 μ m alcanzan los alveolos donde normalmente los bacilos son ingeridos por los macrófagos alveolares y presumiblemente son destruidos, pero los bacilos pueden matarlos o reproducirse en ellos. La persistencia y reproducción de los bacilos pone al huésped en riesgo de reactivación. (18)

La Tb pulmonar posprimaria se desarrolla meses o aún años

después de la primera infección. Bacilos viables diseminados a través de los linfáticos a menudo llegan al torrente sanguíneo y se extienden a nuevos lugares en los pulmones, o a otros órganos incluyendo nódulos linfáticos, meninges, riñones, huesos; dando lugar a deposición extrapulmonar. (1, 18)

En los nódulos linfáticos los linfocitos son activados y generan linfocinas, las que inician la inmunidad mediada por células. La linfocinas también activan los monocitos de la sangre que se presentan en los sitios de infección y maduran en macrófagos.

La respuesta inflamatoria se caracterizan por la formación de granulomas y necrosis por caseificación. La destrucción de tejidos es profunda; es común la fibrosis pulmonar y puede ocurrir la calcificación. (39)

2.2.4. Programa de Prevención y Control.

El Programa de Prevención y Control de la Tuberculosis de la Secretaría de Salud incluye actividades aplicativas de carácter permanente:

De prevención:- Comprende la vacunación con BCG a menores de 15 años y la quimioprofilaxis a niños contactos de alto riesgo.

De diagnóstico y control:- Se integra por la detección y el diagnóstico de casos; el tratamiento y el examen de los contactos convivientes. (37)

Para el tratamiento se dispone de fármacos antituberculosos combinados adecuadamente en esquemas terapéuticos que llevan al enfermo a la curación en todos los casos.

El mejor de que se dispone en la actualidad (comprobado en un estudio multicéntrico 1986-1988) es el de seis meses, que se conoce como tratamiento de corta duración o acortado; consta de dos fases, la primera o intensiva, en la cual se administran Rifampicina, Isoniacida y Pirazinamida, y la segunda o de sostén, hasta completar 6 meses, durante la cual se administran 2 drogas, Rifampicina e Isoniacida. (36)

Estos medicamentos son quimioterapéuticos y antibióticos con capacidad bactericida para M.tuberculosis.

Isoniacida:

Bactericida para microorganismos extra e intracelulares. Interfiere con la formación de la pared celular al inhibir la síntesis de los ácidos micólicos. (44)

Pirazinamida:

Es un quimioterapéutico; su acción es intracelular y requiere de un medio ácido para que se produzca. Interfiere con el transporte de oxígeno. (5)

Rifampicina:

Es un antibiótico semisintético; su actividad antibacteriana es intensa y extensa, actuando sobre diversos gérmenes Gram positivos y negativos, y también sobre diversas micobacterias, entre las que se cuentan el M. tuberculosis y el M. leprae.

Actúa específicamente inhibiendo la síntesis del RNA al interferir la función de la enzima RNA-polimerasa indispensable para su duplicación y formación de proteínas bacterianas. (36)

Los medicamentos antituberculosos restantes como la Estreptomicina, Etambutol, Cicloserina, solo actúan sobre la población extracelular. (36)

Estreptomicina:

Antibiótico bactericida para microorganismos extracelulares. Inhibe la síntesis de proteínas a nivel de la subunidad ribosómica 30S. (5)

Etambutol:

Agente quimioterapéutico con efecto bacteriostático. Sólo actúa sobre la población extracelular. Inhibe la síntesis de los metabolitos necesarios para la multiplicación del bacilo, en especial el RNA. (5)

Cepas de M. tuberculosis han desarrollado resistencia a diferentes drogas antituberculosas. La utilización de monoterapia ejerce un efecto selectivo sobre la población bacilar, permitiendo la emergencia de cepas mutantes resistentes. Este problema se soluciona con la adopción de esquemas de asociación medicamentosa para el tratamiento. (40)

Blancarte, L.M. y cols., publicaron la investigación realizada a nivel nacional para conocer la prevalencia de la resistencia primaria, es decir, la que se observa en un enfermo recién diagnosticado que nunca antes ha recibido drogas antituberculosas, pero que ha sido infectado con una población bacilar hecha resistente en el organismo de la persona que lo infectó.

Los resultados mostraron que de las resistencias encontradas, 62.8% fué a un medicamento, 34.9% a dos, y 2.3% a tres medicamentos. La resistencia primaria a la estreptomina encontrada en México fué del 15.4% y de la Isoniacida el porcentaje encontrado fué del 6.6 (8).

Cabe mencionar que la estreptomina aparecía en el esquema terapéutico de tratamiento de 1984, pero en el actual se ha suprimido.

La investigación y experiencia en quimioterapia de la Tb ha demostrado que medicamentos que actúan sólo en la población

extracelular, como la Estreptomina, el tratamiento debía prolongarse para disminuir al máximo las recaídas. Tratamientos con Rifampicina, Isoniacida y Pirazinamida se logra eficacia terapéutica cercana al 100% en plazo inmediato y reducción a menos del 3% de recaídas a largo plazo. (36)

2.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.

Las formas de diagnóstico incluyen métodos bacteriológicos, radiológicos, clínicos, inmunológicos. El diagnóstico clínico de la Tb se apoya principalmente en el examen bacteriológico. (40)

Las cuatro principales técnicas bacteriológicas disponibles son: examen microscópico o baciloscopia, cultivo, tipificación bioquímica y sensibilidad a las drogas antituberculosas, considerando las dos primeras como básicas en el diagnóstico etiológico y control de tratamiento, y las dos últimas como complementarias. (41)

Baciloscopia:

Constituye el examen prioritario por ser una técnica sencilla, económica y rápida. Los frotis pueden prepararse de dos formas: frotis directo o frotis concentrado. (21)

Para la observación de los bacilos acidorresistentes, se tiñen los frotis por la técnica de Ziehl-Neelsen; los bacilos tuberculosos aparecen como bastoncillos rojos muy delgados, con

frecuencia en haces pequeños en que los bacilos se encuentran paralelos o dispuestos en ángulos agudos entre sí; el fondo del campo es azul pálido. También se emplea microscopía con fluorescencia por tinción con auramina-rodamina. (25)

Cultivo:

Es una técnica más sensible que la baciloscopia y los resultados se obtienen entre 25 y 30 días dado las características de lenta multiplicación y desarrollo de las micobacterias. Además de su utilidad diagnóstica, se puede confirmar fracasos terapéuticos, precisar la especie mediante la tipificación bioquímica y efectuar las pruebas de sensibilidad a las drogas. (21)

El medio de cultivo más utilizado es el de Lowenstein-Jensen (L-J) por ser suficientemente sensible y de costo relativamente bajo. (25)

Para la recuperación de las micobacterias del primocultivo en las pruebas de sensibilidad, se emplea el medio de L-J y se requieren 18 días para recuperar las colonias.

Se ha publicado recientemente que por métodos radiométricos las colonias se recuperan en 7 días. (33) En esta técnica se utiliza el medio especial 7H12 Middlebrook y el sistema radiométrico consiste en la medición del CO producido por el metabolismo de las micobacterias a partir de un sustrato marcado con C . (41)

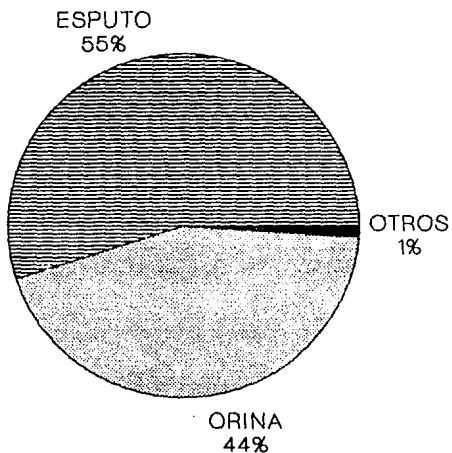
3.0 O B J E T I V O S .

El objetivo general de este trabajo fué conocer la prevalencia de tuberculosis, a través de baciloscopias y cultivos de muestras clínicas de pacientes sospechosos de la enfermedad que acuden al HGZ/MF-58, Las Margaritas del IMSS.

Para tal estudio se plantearon lo siguientes objetivos:

- a) Comparar el trabajo para obtención de frotis positivos con y sin descontaminación de las muestras.
- b) Realizar cultivo de muestras clínicas para aislar micobacterias en medio específico.
- c) Determinar Género y precisar la especie de Mycobacterium con pruebas bioquímicas, de los cultivos sospechosos de micobacterias.
- d) Analizar la prevalencia de tuberculosis, de los últimos cinco años, de pacientes diagnosticados en el área de influencia del HGZ/MF-58, Las Margaritas del IMSS.

MATERIAL BIOLÓGICO



Total de muestras trabajadas durante el período
de trabajo Julio-Diciembre, 1989

El trabajo se dividió en dos etapas:

I. Análisis por baciloscopias y cultivos de todas las muestras clínicas recibidas.

a) Método Directo (MD)

Frotis directo sin descontaminación de la muestra.

Durante el periodo de Julio a Diciembre de 1989 se trabajaron todas las muestras por el método directo, que es la rutina de trabajo que se sigue en el laboratorio del HGZ/MF-58 para el diagnóstico presuntivo de Tb. (21)

II. Comparación del trabajo de obtención de frotis positivos con y sin descontaminación de la muestra.

a) Método Directo (MD)

a) Método Concentración-Descontaminación (MCD)

Tratamiento de la muestra por Hidrólisis alcalina. (21, 29, 38)

Con el objeto de contar con una muestra representativa, a partir de la segunda mitad del mes de octubre se reunieron aleatoriamente un total de 897 muestras aplicándole a cada una de ellas los dos métodos. (tabla 1)

TABLA 1

NUMERO Y TIPO DE MUESTRAS CLINICAS PARA EL ESTUDIO
COMPARATIVO DE OBTENCION DE FROTIS POSITIVOS POR LOS
METODOS DE:

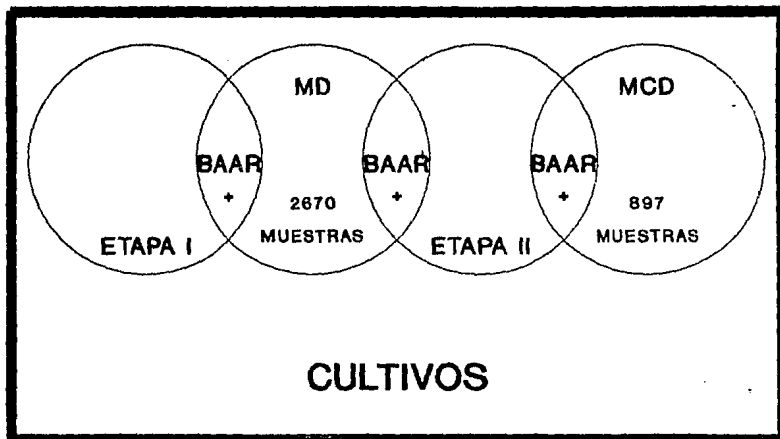
A) METODO DIRECTO, (21)

B) METODO DE CONCENTRACION DESCONTAMINACION. (29)

| Fecha | Muestra clínica: | | | Total |
|-----------------|------------------|-------|--------|-------|
| | Espudo | Orina | Otros* | |
| Octubre, 1989 | 101 | 87 | - | 188 |
| Noviembre, 1989 | 189 | 217 | 4 | 410 |
| Diciembre, 1989 | 193 | 104 | 2 | 299 |
| | <hr/> | <hr/> | <hr/> | <hr/> |
| | 483 | 408 | 6 | 897 |

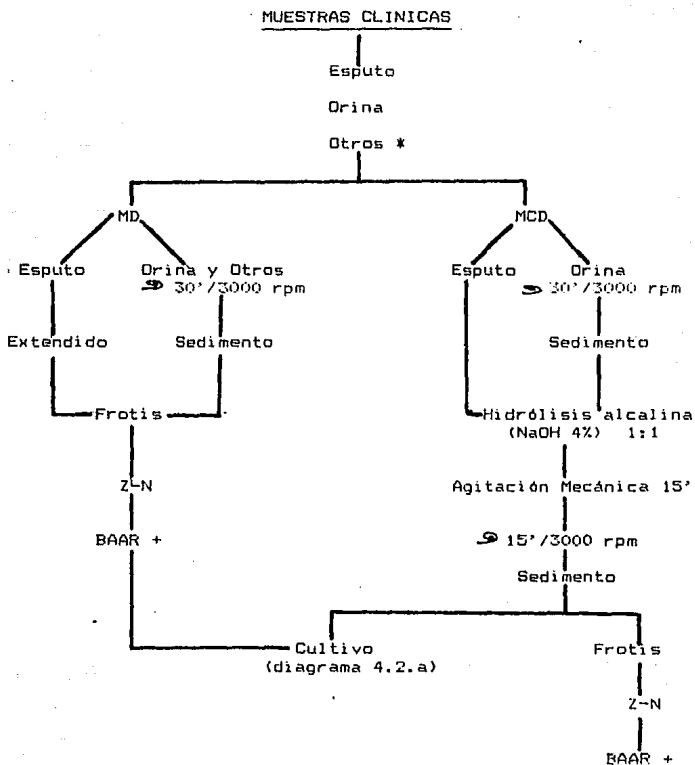
* Líquido pleural, Jugo gástrico.

Una vez examinadas las baciloscopias incluídas tanto las de la primera como las de la segunda etapa, a los BAARES positivos resultantes de lo que se logró obtener una segunda muestra, se les hizo un sembrado en medio de cultivo de Lowenstein-Jensen (LJ).



La figura representa los cultivos hechos a partir de BAARES positivos, tanto de la primera como de la segunda etapa.

4.2 DIAGRAMA DE FLUJO



* Líquido pleural y lavados gástricos.

Diagrama 4.2.a

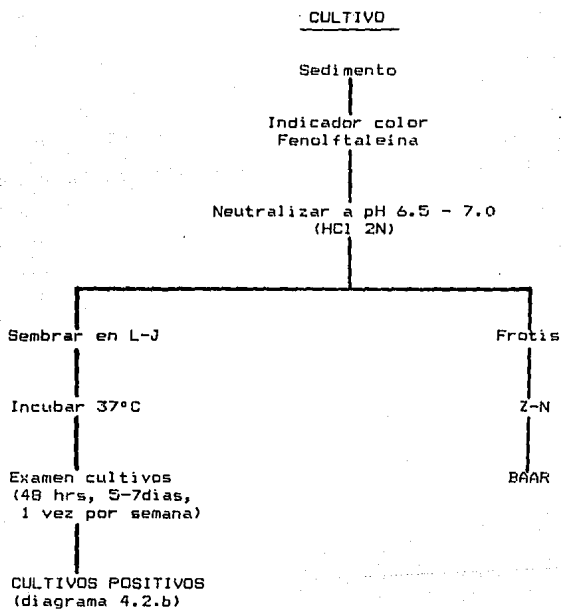
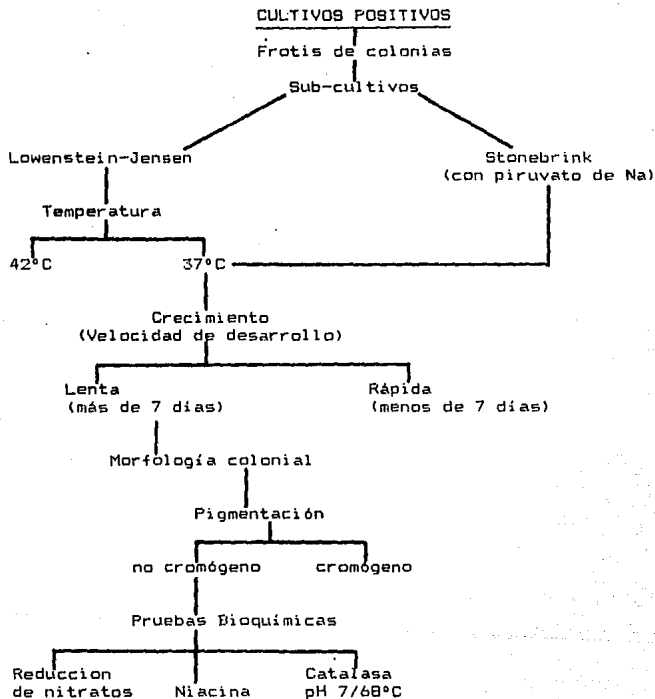


Diagrama 4.2.b



4.3 METODOLOGIA.

DEMOSTRACION DE BAAR EN FROTIS COLOREADOS.

El proceso de las muestras para la preparación de los frotis variaron según el tipo de muestra y el método a utilizar

Esputo.-

a) Método Directo (MD)

A las expectoraciones se les seleccionó la partícula idónea, constituida por la parte purulenta o más densa de la misma, colocándola sobre el portaobjetos y extendiéndola con el aplicador de madera.

b) Método Concentración-Descontaminación (MCD)

Se utilizó el método de Hidróxido de Sodio (método de Petroff), (29) agregando a cada muestra de esputo un volumen igual de NaOH 4% y sometiéndola a movimiento constante durante 15 minutos en un agitador de Kahn, permitiendo así la licuefacción del moco, liberar al bacilo, eliminar flora asociada y facilitar la concentración por centrifugación. Posteriormente se centrifugó 15'/3000 rpm. eliminándose el sobrenadante en un recipiente conteniendo fenol al 5%. Se hizo frotis del sedimento.(29)

Si la baciloscofia resultaba positiva el sedimento era

reservado para ser sembrado y se neutralizó con HCl 2N. Se añadió 1-2 gotas de indicador de color de fenolftaleína seguido del agregado de gotas de HCl hasta el cambio de color, de rojo a incoloro o ligeramente rosado. Con la ayuda de un aplicador de madera estéril, se corroboró el pH con tira indicadora de pH el cual debe estar entre 6.5-7.0 (29)

Orina.-

a) MD

Las muestras de orina se centrifugaron 30'/3000 rpm. eliminando el sobrenadante y haciendo frotis del sedimento.

b) MCD

La orina después de la primera centrifugación y obtenido el sedimento, se resuspendió en un volumen igual de NaOH 4% permitiendo la descontaminación durante 15 minutos, concentrando por centrifugación 30'/3000 rpm. y se hizo frotis del sedimento.

Para el caso de sembrado de la muestra, se continuó trabajando el sedimento como en la forma descrita para esputo.

Otras muestras:-

En el tratamiento de la muestras de lavado gástrico, se efectuó centrifugación 30'/3000 rpm y se procedió como en la muestra de orina.

Con las muestras de líquido pleural se prescindió de la descontaminación previa por ser líquido de punción; se centrifugó, desechó el sobrenadante y se hizo frotis del sedimento.

Proceso de coloración:

A todos los frotis preparados una vez secos a temperatura ambiente, se fijaron con metanol tibio, efectuando la tinción del extendido por el método de Ziehl-Neelsen. (Z-N) (29)

Finalmente, los frotis coloreados se examinaron al microscopio estableciendo si se encontraron o no BAAR en el extendido; si los había presentes los resultados se registraron como sigue:

- (+) Menos de un BAAR por campo en promedio, en 100 campos observados.
- (++) Uno a 10 BAAR por campo en promedio, en 50 campos observados.
- (+++) Más de 10 BAAR por campo en 20 campos observados. (21, 29)

AISLAMIENTO DE MICOBACTERIAS.

A las muestras sospechosas que presentaban BAAR, se les hizo cultivo en medio de Lowenstein-Jensen (L-J).

Con una pipeta Pasteur esterilizada se sembraron 4 gotas del neutralizado en el tubo con el medio de cultivo (L-J), cuidando que éstas cubran la superficie del medio manteniéndolos en posición inclinada. Se preparó un frotis del residuo que quedó en la pipeta tñiéndolo por Z-N.

Una vez sembrados los tubos se colocaron, con el tapón flojo, en una caja de fondo inclinado en posición casi horizontal e incubándolos a 37°C en una estufa cerrada. Se examinaron los tubos a las 48 hrs. después de la inoculación y estando evaporada la parte líquida de la siembra, se ajustaron firmemente las tapas para impedir la desecación del medio durante el tiempo de incubación.

Se efectuaron revisiones posteriores a los 5-7 días y después una vez por semana. A los tubos en que hubo desarrollo se registró el tiempo de crecimiento, se hizo un frotis de las colonias sospechosas tñiéndolo con Z-N y cuando se observaron BAAR se hizo resiembra para su posterior tipificación bioquímica.

IDENTIFICACION DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.

Los estudios de tipificación bioquímica de los microorganismos cultivados se efectuaron en el Laboratorio Central de la Tuberculosis, de la Dirección General de Control de la Tuberculosis y de las Enfermedades del Aparato Respiratorio, de la S.S.A.

A los cultivos recibidos en este laboratorio, se les efectuó primeramente una baciloscopia para confirmar la presencia de BAAR y posteriormente se hicieron subcultivos por triplicado en medio de L-J y Stonebrink, este último útil para el primocultivo de M. bovis. (21,29)

Una vez hecha una subdivisión preliminar basada en las características de crecimiento, temperatura y velocidad de desarrollo, pigmentación y morfología colonial, se procedió a la identificación diferencial del M. tuberculosis por medio de pruebas bioquímicas.

Pruebas bioquímicas.

La clasificación exacta de M. tuberculosis se logró con las pruebas de Niacina, Reducción de Nitrato y Catalasa pH 7/68°C (42)

Reducción de Nitratos:

Para probar la presencia de la enzima nitrato reductasa en M.tuberculosis, a un tubo con unas gotas de agua destilada estéril se emulsionó una asada de cultivo micobacteriano, se añadieron 2 ml. de substrato de nitrato de sodio mezclando por agitación e incubando a 37°C durante dos horas. Se añadieron una gota de HCl 1:1, 2 gotas de solución de sulfanilamida 0.2% y 2 gotas de solución de diclorhidrato de n-naftil etilendiamina 0.1%. Se observó desarrollo o no de color comparándose con controles positivos y negativos. El control positivo desarrolla un color rojo intenso. (42)

Catalasa termoestable pH 7/68°C:

Para analizar la susceptibilidad al calentamiento a 68°C a pH 7 de la enzima catalasa característica de M.tuberculosis así como de M.bovis y M.gastri, se emulsionó una asada del cultivo en 0.5 ml de buffer de fosfatos M/15, pH 7; se colocó en baño maría a una temperatura constante de 68°C durante 20 minutos. Se retiró del baño y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente se añadió al tubo 0.5 ml. de una mezcla de tween-80, 10% y peróxido de hidrógeno, 30% en volúmenes iguales. Se observó el desarrollo o no de burbujas. (24, 42)

Prueba de Niacina:

Con el objeto de detectar la acumulación de niacina hidrosoluble producida por M. tuberculosis en el medio de cultivo, al tubo de L-J con las colonias crecidas se adicionó 0.5 ml. de agua destilada estéril y se colocó casi en posición horizontal permitiendo que el líquido estuviera en contacto con el medio durante 15 minutos.

Se traspasaron 0.5 ml. de este líquido a un tubo limpio y se le agregaron 0.5 ml. de solución de anilina al 4% y 0.5 ml. de bromuro de cianógeno al 10%. Se observó la aparición o no de color, comparando con controles positivos y negativos. El control positivo desarrolla un color amarillo. (29)

En la siguiente tabla se encuentran las pruebas diferenciales que se realizan de rutina en el Laboratorio Central de la Tuberculosis, donde se llevó a cabo la tipificación y que sirvieron para la identificación de las cepas encontradas.

Características para la identificación de micobacterias*

| Organismo | Aislamiento óptimo Temperatura y velocidad de desarrollo | Desarrollo de pigmento en | | Prueba de la niacina | Reducción de nitratos | Catalasa | | Hidrólisis de Tween 80 10 días | Ariilsulfatasa 3 días | Ureasa | Resistencia a la T ₂ H 1 µg/ml | Desarrollo en NaCl 5% | Captación de hierro |
|--|--|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------|--------|---|--------------------------|------------------------|
| | | Luz | Oscuridad | | | Semi cuantitativat | pH 7 68° C | | | | | | |
| <i>M. tuberculosis</i> | 37° C 12-25 d | Amarillo mate | Amarillo mate | - | 3-5+ | <40 | - | = | - | - | - | - | - |
| <i>M. africanum</i> | 37° C 31-42 d | Amarillo mate | Amarillo mate | V | V | <20 | - | = | - | - | - | - | - |
| <i>M. bovis</i> | 37° C 24-40 d | Amarillo mate | Amarillo mate | V | - | <20 | - | = | - | - | - | - | - |
| <i>M. ulcerans</i> | 32° C 28-60 d | Amarillo mate | Amarillo mate | - | - | >50 | - | = | - | - | - | - | - |
| <i>M. kansasii</i> | 37° C 10-20 d | Amarillo | Amarillo mate | - | 1-5+ | >50 | - | = | - | - | - | - | - |
| <i>M. monnum</i> | 31-32° C 5-14 d | Amarillo | Amarillo mate | V | - | <40 | = | = | - | - | - | - | - |
| <i>M. simiae</i> | 37° C 7-14 d | Amarillo*** | Amarillo mate | - | = | >50 | - | = | - | - | - | - | - |
| <i>M. szulgai</i> | 37° C 12-25 d | Amarillo a naranja | Amarillo mate-25° C | - | = | >50 | - | = | - | - | - | - | - |
| <i>M. scrofulaceum</i> | 37° C +10 d | Amarillo | Amarillo | - | - | >50 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>M. goodii</i> | 37° C +10 d | Amarillo a naranja | Amarillo | - | - | >50 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>M. flavescens</i> | 37° C 7-10 d | Amarillo | Amarillo | - | - | >50 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>M. xenopi</i> | 42° C 14-28 d | Amarillo | Amarillo | - | - | <40 | - | = | - | - | - | - | - |
| <i>M. intracellulare- avium (complejo)</i> | 37° C 10-21 d | Amarillo mate | Amarillo mate a claro | - | - | <40 | - | = | - | - | - | - | - |
| <i>M. gastri</i> | 37° C 10-21 d | Amarillo mate | Amarillo mate | - | - | <40 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>M. terrae (com- plejo)</i> | 37° C 10-21 d | Amarillo mate | Amarillo mate | - | 1-5- | >50 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>M. triviale</i> | 37° C 10-21 d | Amarillo mate | Amarillo mate | - | 1-5+ | >50 | - | = | - | - | - | - | - |
| <i>M. fortuitum</i> | 37° C 3-5 d | Amarillo mate | Amarillo mate | - | 2-5+ | >50 | - | = | - | - | - | - | - |
| <i>M. chelonae</i> | 37° C 3-5 d | Amarillo mate | Amarillo mate | V | - | >50 | - | - | - | - | - | - | - |
| spp. <i>chelonae</i> | 37° C 3-5 d | Amarillo mate | Amarillo mate | V | - | >50 | - | - | - | - | - | - | - |
| spp. <i>abscessus</i> | 37° C 3-5 d | Amarillo mate | Amarillo mate | - | - | >50 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>M. smegmatis</i> | 37° C 3-5 d | Amarillo mate a amarillo | Amarillo mate | - | 1-5- | >50 | = | - | - | - | - | - | - |

* Reproducción autorizada American Society of Clinical Pathologists, De Sommers, H. M.: The identification of mycobacteria. Technical Improvement Service, vol. 28, 1977.
 + 84% de cepas ++, 50-84% =, 11-43% -, 16% de cepas -; V, variable; espacios en blanco, escasos datos o ninguno.
 † Los números indican mm de burbujas.

‡ NH, las cepas resistentes pueden ser negativas
 ** Positiva (mayoría) en 24-48 horas.
 *** Fotocromogenicidad inestable con subcultivos repetidos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El tratamiento estadístico aplicado a los resultados fué el Análisis de varianza , utilizando para ello los siguientes estimadores:

$$\text{Suma de cuadrados de Tratamientos: } SCTr = \frac{1}{nr} \left[\sum_i T_i^2 \right] - \frac{1}{knr} (T..)^2$$

$$\text{Suma de cuadrados de Bloques: } SCB = \frac{1}{kr} \left[\sum_j T_j^2 \right] - \frac{1}{knr} (T..)^2$$

$$\text{Suma de cuadrados de Error: } SCE = \frac{1}{r} \left[\sum_{ij} W_{ij}^2 \right] - \frac{1}{knr} (T..)^2$$

$$F \text{ calculada} = \frac{\text{Media de cuadrados de Tr y/o B}}{\text{Media de cuadrados de Error}}$$

Siendo SCTr, SCB, SCE, estimadores de σ^2 , y distribución F, estimador puntual de σ^2

Donde:

SC = Suma de cuadrados.

Tr = Tratamientos = Métodos (MD, MCD)

B = Bloques = Tipo muestra (esputo, orina)

E = Error estándar

n = N° de bloques

k = N° de tratamientos

r = N° de repeticiones

$T_{..}$ = Gran Total

T_i = Total del i-ésimo tratamiento

T_j = Total del j-ésimo bloque

W_{ij} = Total del i-ésimo tratamiento y del j-ésimo bloque

$$\text{Media de cuadrados} = MC = \frac{SC}{g.l.}$$

donde: g.l. = grados de libertad

f = Desviación estandar

f^2 = Varianza

5.0 RESULTADOS.

En el cuadro 1 se analiza el total de muestras investigadas mediante la baciloscopia y cuántas de ellas resultaron positivas.

El total de muestras trabajadas durante el semestre de trabajo fué de 2,670, y el total de casos diagnosticados por BAAR positivos con y sin tratamiento, fueron 63 los cuales corresponden 30 (47.6%) a expectoración y 33 (52.4%) a orina.

En la figura 1, se observan el total de casos diagnosticados mediante baciloscopías positivas y la procedencia de la muestra. En los meses de Julio a Octubre se obtuvieron BAAR + sin descontaminación; durante Noviembre y Diciembre se hizo tratamiento por los dos métodos (MD-MCD).

En el cuadro 2 se muestran los resultados del estudio comparativo de obtención de BAAR a partir de muestras con y sin tratamiento. De las 897 muestras procesadas simultáneamente por los dos métodos, se obtuvieron 20 frotis positivos por MD que representa un rendimiento de positividad del 2.23%; por el MCD se obtuvieron 50 frotis positivos con un rendimiento de positividad del 5.57%.

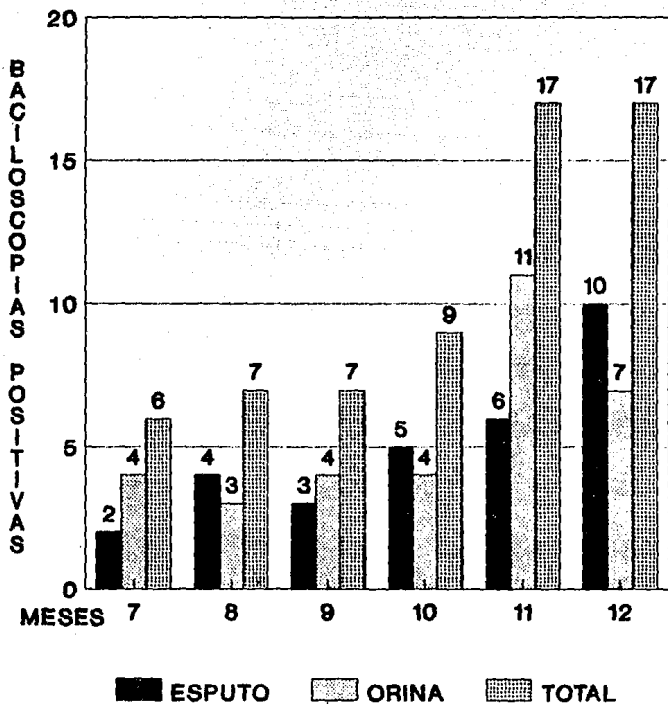
La figura 2, analiza la comparación de estos resultados mostrando un franco aumento en el rendimiento de positividad cuando la muestra fué tratada por MCD.

CUADRO 1

BACILOSCOPIAS POSITIVAS 1989

| | Baciloscopias para búsqueda de BAAR | Obtención frotis positivos: | | | Porcentaje |
|---------------|-------------------------------------|-----------------------------|---------------|-------|------------|
| | | Espujo | Orina | Total | |
| Enero | 322 | 3 | 4 | 7 | 2.17 |
| Febrero | 447 | 2 | 8 | 10 | 2.24 |
| Marzo | 325 | 1 | 3 | 4 | 1.23 |
| Abril | 380 | 1 | - | 1 | 0.26 |
| Mayo | 311 | - | 1 | 1 | 0.32 |
| Junio | 291 | 1 | - | 1 | 0.34 |
| 1er. semestre | 1076 | 8 | 16 | 24 | 2.23 |
| Julio | 376 | 2 | 4 | 6 | 1.6 |
| Agosto | 489 | 4 | 3 | 7 | 1.43 |
| Septiembre | 478 | 3 | 4 | 7 | 1.46 |
| Octubre | 456 | 5 | 4 | 9 | 1.97 |
| Noviembre | 452 | 6 | 11 | 17 | 3.76 |
| Diciembre | 419 | 10 | 7 | 17 | 4.06 |
| 2º semestre: | 2670 | 30 (47.6%) | 33 (52.4%) | 63 | 2.35 |
| Total: | 4746 | 38 | 49 | 87 | |

Los datos observados muestran el número total de muestras investigadas mediante baciloscopias en el semestre en el que se desarrolló el trabajo (Julio-Diciembre 1989) y el total de casos diagnosticados por BAAR positivos incluyendo los reportados en el primer semestre.



**FIG. 1: BAARES POSITIVOS
SEGUNDO SEMESTRE DE 1989**

CUADRO 2

ESTUDIO COMPARATIVO DE OBTENCION DE FROTIS

POSITIVOS POR DOS METODOS: MD , MCD

| Muestra clinica | Número de muestras | Positivos MD | % de (+) respecto al No.de muestras | Positivos MCD | % de (+) respecto al No.de muestras |
|-----------------|--------------------|--------------|-------------------------------------|---------------|-------------------------------------|
| Espujo | 483 | 6 | 1.24 | 19 | 3.93 |
| Orina | 408 | 14 | 3.43 | 31 | 7.59 |
| Otros * | 6 | | | | |
| | 897 | 20 | \bar{X} : 2.23 | 50 | \bar{X} : 5.57 |

1 MD = Metodo Directo

2 MCD = Metodo concentración-descontaminación

* Otros: Líquido Pleural, lavado gástrico.

COMPARACION DE RESULTADOS POR DOS METODOS

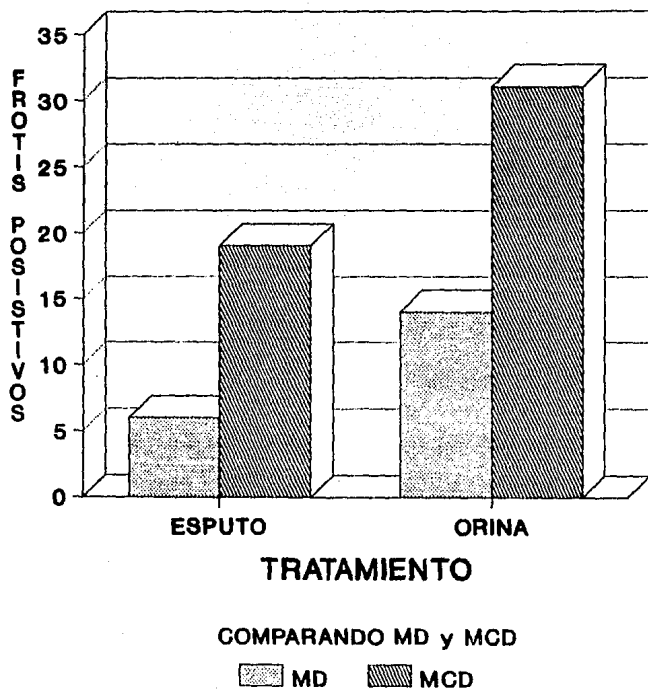


FIGURA 2 : GRAFICA A

COMPARACION DE RESULTADOS POR DOS METODOS

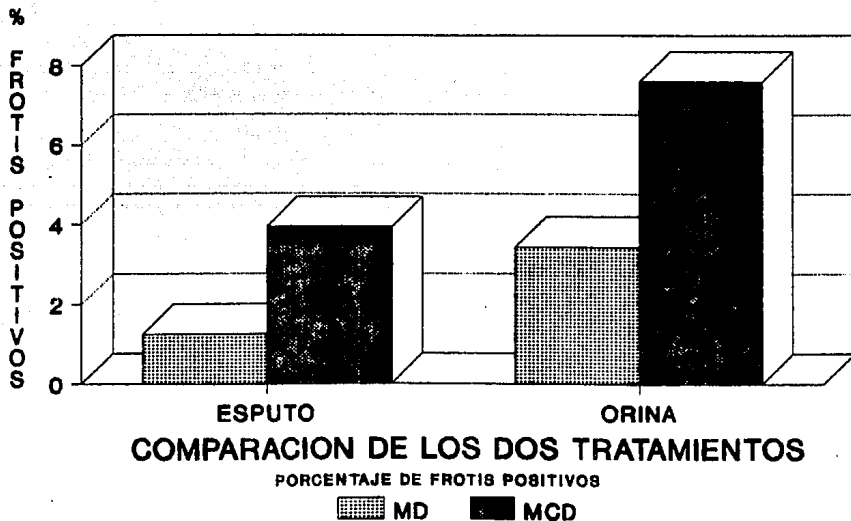


FIGURA 2: GRAFICA B

Cultivos.

Con el fin de efectuar la recuperación de las micobacterias en medio de cultivo y caracterizarlas bioquímicamente, a una segunda muestra sospechosa se le hizo tratamiento MCD y sembrada en L-J. En el cuadro 3, se tabulan los cultivos hechos a partir de baciloscopias positivas, las lecturas de éstas, así como el diagnóstico clínico inicial.

En el cuadro 4 y figura 3, se muestran los resultados correspondientes a los cultivos. De un total de 32, 27 cultivos fueron negativos y 5 positivos, lo que representa un 84.4% y un 15.6% respectivamente.

En base al análisis de las características de crecimiento, morfología y pigmentación colonial, así como de las características diferenciales mostradas en el cuadro 5, la especie identificada en las cepas aisladas de los cultivos fué

Mycobacterium tuberculosis.

CUADRO 3

CULTIVOS REALIZADOS DE MUESTRAS SOSPECHOSAS POR BAAR POSITIVOS
JULIO - DICIEMBRE 1989

| | Tubo No. | Tipo muestra | Diagnóstico | Lámina No. | Lectura (Cant bacilos) | Reporte BAAR | Resultado cultivo |
|--------|----------|--------------|-----------------------------|------------|------------------------|--------------|-------------------|
| Jul/89 | 5 | Ø | Probable Tb Renal | 1 | 93 | ++ | negativo |
| | 9 | E | Probable Tb Pulmonar | 3 | incont | +++ | positivo |
| | 12 | Ø | Sin diagnóstico | 4 | 12 | + | negativo |
| | 14 | Ø | Tb-Infecc. Vías Urinarias | 5 | 75 | + | negativo |
| | 17 | E | Control Tb Pulmonar | 6 | 48 | + | negativo |
| Ago/89 | 18 | Ø | Control Tb Renal | 8 | 89 | ++ | negativo |
| Sep/89 | 19 | Ø | Tb Renal activa | 15 | 3 | + | negativo |
| | 20 | Ø | Tb Renal/Hematuria | 16 | 4 | + | negativo |
| | 22 | E | Tb Pulmonar | 18 | 13 | + | negativo |
| | 23 | E | Descartar Tb Pulmonar | 19 | 62 | + | negativo |
| | 24 | Ø | Tb Renal/IVU | 17 | 4 | + | negativo |
| | 25 | E | Tb Pulmonar activa DM | 20 | incont | +++ | positivo |
| Oct/89 | 28 | E | Descartar Tb Pulmonar | 22 | 172 | +++ | negativo |
| | 29 | Ø | Hematuria, DM. | 25 | 13 | + | negativo |
| | 30 | E | Rinitis, Bronq. crónica | 21 | 3 | + | negativo |
| | 31 | Ø | Hematuria | 23 | 5 | + | negativo |
| | 33 | E | Bronq. crónica, DM | 26 | 4 | + | negativo |
| Nov/89 | 34 | Ø | Tb Renal | 29 | 6 | + | negativo |
| | 35 | E | EPDC secuela Tb Pulmonar | 30 | 4 | + | negativo |
| | 36 | Ø | Probable Tb Renal | 31 | 7 | + | negativo |
| | 37 | E | Tb Pulmonar | 32 | 89 | ++ | positivo |
| | 38 | Ø | Hematuria | 33 | 32 | + | negativo |
| | 39 | E | Sin diagnóstico | 34 | 5 | + | negativo |
| | 40 | Ø | Litiasis, probable Tb Renal | 35 | 3 | + | negativo |
| | 41 | E | Rinitis | 36 | 4 | + | negativo |
| | 45 | Ø | Litiasis, probable Tb Renal | 39 | 7 | + | negativo |
| | 46 | Ø | Hipertemia | 40 | 6 | + | negativo |
| | 47 | E | Probable Tb Pulmonar | 45 | incontab | +++ | positivo |
| Dic/89 | 49 | Ø | DM. descartar Tb Renal | 49 | 4 | + | negativo |
| | 56 | Ø | Descartar Tb Renal | 57 | 7 | + | negativo |
| | 57 | E | Tos crónica | 55 | 5 | + | negativo |
| | 58 | Ø | Tb Renal | 59 | incontab | +++ | positivo |
| | Total | | 18 | 14 | | | |

- + Menos de 1 bacilo por campo promedio, en 100 campos observados
 ++ 1 a 10 bacilos por campo promedio, en 50 campos observados
 +++ Más de 10 bacilos por campo, en 20 campos observados.

E = Espudo

Ø = Orina

EPDC = Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

DM = Diabetes Mellitus

IVU = Infección Vías Urinarias

CUADRO 4

CULTIVOS OBTENIDOS PARA LA DETERMINACION DE GENERO
 MYCOBACTERIUM, PERIODO JULIO-DICIEMBRE 1989

| Muestra | Total de cultivos | (-) | (+) | % (+) respecto muestra | % (+) respecto al total |
|------------|-------------------|------|------|------------------------|-------------------------|
| Espuito | 14 | 10 | 4 | 28.57 | 12.5 |
| Orina | 18 | 17 | 1 | 5.55 | 3.1 |
| | 32 | 27 | 5 | | 15.6 |
| Porcentaje | 100 | 84.4 | 15.6 | | |

CULTIVOS POSITIVOS A PARTIR DE BAAR (+)

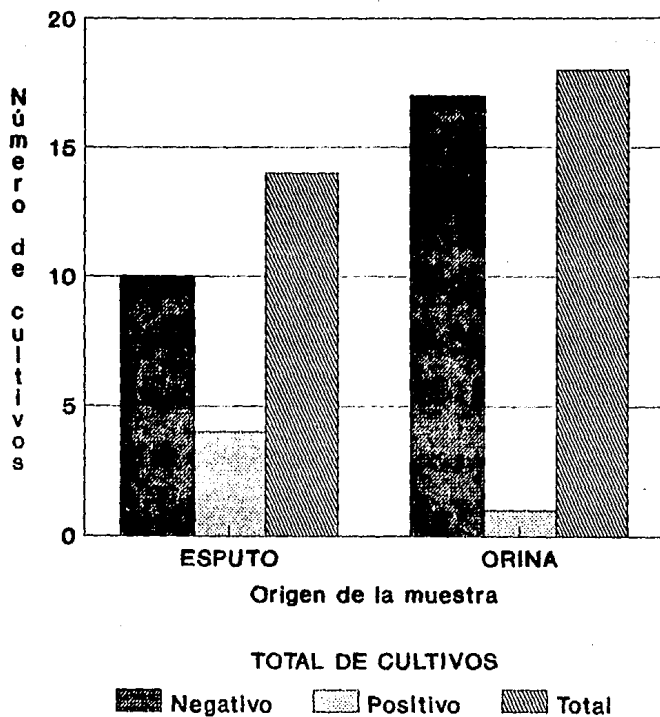


FIGURA 3: GRAFICA A

CULTIVOS POSITIVOS A PARTIR DE BAAR (+)

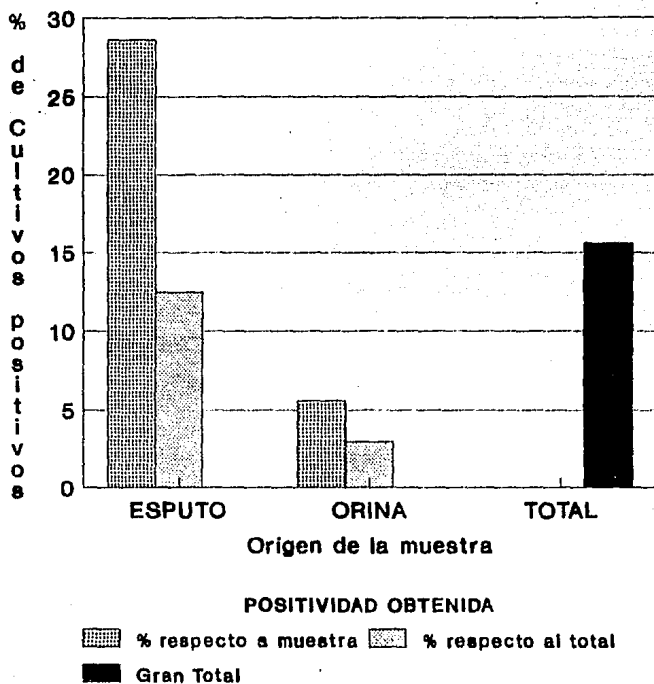


FIGURA 3: GRAFICA B

CUADRO 5

RESULTADO DE LAS ESPECIES IDENTIFICADAS

| Cepa | Morfo- logia colonial | Pigmenta ción | Creci- miento | Nia- cina | Reducc nitrato | Catalasa pH 7/68°C | Especie |
|------|-----------------------------|--------------------|------------------|--------------|-------------------|-----------------------|------------------------|
| 1 | lisas secas | crema pálido | 20 días | + | 4+ | Negativo | <u>M. tuberculosis</u> |
| 2 | lisas secas | crema pálido | 30 días | + | 3+ | Negativo | <u>M. tuberculosis</u> |
| 3 | lisas húmedas | crema pálido | 17 días | + | 3+ | Negativo | <u>M. tuberculosis</u> |
| 4 | lisas secas | amarillo pálido | 24 días | + | 3+ | Negativo | <u>M. tuberculosis</u> |
| 5 | lisas húmedas | crema pálido | 22 días | + | 4+ | Negativo | <u>M. tuberculosis</u> |

Estadística.

Con el objeto de analizar la frecuencia de Tb en los últimos cinco años, se integraron los datos del cuadro 6 que muestra la población adscrita al HGZ/MF-58 durante el período 1985-1989.

Con los datos estadísticos recopilados se conocieron los casos existentes de Tb, todas formas diagnosticados por baciloscopias: éstos se muestran en el cuadro 7 y figura 4. Por los resultados obtenidos se observa un incremento de casos en el año de 1988, mientras que los otros años analizados permanecen sin variaciones significativas.

En el cuadro 8 y figura 5, se presentan los resultados del índice de prevalencia de Tb todas formas, definido como: "La proporción de una población dada que muestra la enfermedad en un momento dado del tiempo". (21)

En el análisis de este índice se encontró que hubo una mayor prevalencia en el año de 1988 con 101 casos (antiguos y nuevos) por cada 100,000 adscritos seguida del año de 1989 con 76 casos por cada 100,000 asegurados de la población adscrita, lo que indica un pequeño repunte de Tb en los dos últimos años.

CUADRO 6

POBLACION ADSCRITA AL HGZ/MF-58 DEL IMSS, 1985-1987

| Año | Mes | Permanentes | Eventuales | Total | \bar{X} |
|------|------------|-------------|------------|---------|-----------|
| 1985 | Enero | 136,391 | 1,124 | 137,515 | 138,901.2 |
| | Febrero | 132,136 | 1,175 | 133,311 | |
| | Marzo | 132,706 | 1,250 | 133,956 | |
| | Abril | 134,511 | 1,322 | 135,833 | |
| | Mayo | 135,298 | 1,376 | 136,674 | |
| | Junio | 136,535 | 1,446 | 137,981 | |
| | Julio | 137,882 | 1,473 | 139,355 | |
| | Agosto | 140,551 | 1,533 | 142,084 | |
| | Septiembre | 138,884 | 1,545 | 140,429 | |
| | Octubre | 139,132 | 1,554 | 140,686 | |
| | Noviembre | 142,209 | 1,582 | 143,791 | |
| | Diciembre | 143,597 | 1,602 | 145,199 | |
| 1986 | Enero | 145,033 | 1,624 | 146,657 | 154,810.2 |
| | Febrero | 146,275 | 1,643 | 147,918 | |
| | Marzo | 149,488 | 1,686 | 151,174 | |
| | Abril | 151,497 | 1,708 | 153,205 | |
| | Mayo | 153,171 | 1,726 | 154,897 | |
| | Junio | 154,608 | 1,756 | 156,364 | |
| | Julio | 155,705 | 1,774 | 157,479 | |
| | Agosto | 157,475 | 2,169 | 159,644 | |
| | Septiembre | 158,215 | 2,193 | 160,408 | |
| | Octubre | 161,379 | 2,240 | 163,619 | |
| | Noviembre | 152,727 | 2,292 | 155,019 | |
| | Diciembre | 149,031 | 2,307 | 151,338 | |
| 1987 | Enero | 148,045 | 2,354 | 150,399 | 155,510.7 |
| | Febrero | 147,838 | 2,327 | 150,165 | |
| | Marzo | 148,338 | 2,363 | 150,701 | |
| | Abril | 152,016 | 2,398 | 154,414 | |
| | Mayo | 153,578 | 2,428 | 156,006 | |
| | Junio | 154,294 | 2,486 | 156,780 | |
| | Julio | 156,118 | 2,523 | 158,641 | |
| | Agosto | 156,060 | 2,588 | 158,648 | |
| | Septiembre | 155,893 | 2,619 | 158,512 | |
| | Octubre | 155,661 | 2,659 | 158,320 | |
| | Noviembre | 154,497 | 2,671 | 157,170 | |
| | Diciembre | 153,683 | 2,689 | 156,372 | |

Continuación cuadro 6

| Año | Mes | Permanentes | Eventuales | Total | \bar{X} |
|------|------------|-------------|------------|---------|------------|
| 1988 | Enero | 152,342 | 2,705 | 155,047 | 144,853.5 |
| | Febrero | 152,040 | 2,734 | 154,774 | |
| | Marzo | 153,901 | 2,778 | 156,679 | |
| | Abril | 154,936 | 2,795 | 157,731 | |
| | Mayo | 158,646 | 2,831 | 161,477 | |
| | Junio | 160,135 | 2,892 | 163,027 | |
| | Julio | 162,204 | 2,927 | 165,131 | |
| | Agosto | 121,675 | 2,946 | 124,621 | |
| | Septiembre | 122,536 | 2,975 | 125,511 | |
| | Octubre | 120,648 | 2,996 | 123,644 | |
| | Noviembre | 121,579 | 3,009 | 124,588 | |
| | Diciembre | 122,967 | 3,045 | 126,012 | |
| 1989 | Enero | 123,568 | 3,062 | 126,630 | 114,404.25 |
| | Febrero | 124,259 | 3,071 | 127,330 | |
| | Marzo | 125,065 | 3,080 | 128,145 | |
| | Abril | 103,205 | 3,085 | 106,290 | |
| | Mayo | 103,941 | 3,094 | 107,035 | |
| | Junio | 104,791 | 3,114 | 107,905 | |
| | Julio | 105,695 | 3,138 | 108,833 | |
| | Agosto | 107,013 | 3,145 | 110,158 | |
| | Septiembre | 108,451 | 3,193 | 111,644 | |
| | Octubre | 109,697 | 3,342 | 113,039 | |
| | Noviembre | 110,929 | 3,351 | 114,280 | |
| | Diciembre | 108,513 | 3,049 | 111,562 | |

FUENTE: Instituto Mexicano del Seguro Social

Subdirección General Médica

Informe Mensual de Servicios Médicos

HGZ/MF-58

CUADRO 7

BACILOSCOPIAS POSITIVAS PERIODO 1985-1989

| Año | BAAR en muestras de: | | | Total |
|------|----------------------|-------|--------|-------|
| | Espuito | Orina | Otros* | |
| 1985 | 74 | 13 | | 87 |
| 1986 | 66 | 17 | | 83 |
| 1987 | 58 | 18 | 3 | 79 |
| 1988 | 114 | 27 | 5 | 146 |
| 1989 | 38 | 49 | | 87 |

* Líquido pleural y/o Líquido ascítico, y/o Jugo gástrico.

CASOS DE TUBERCULOSIS DIAGNOSTICADOS

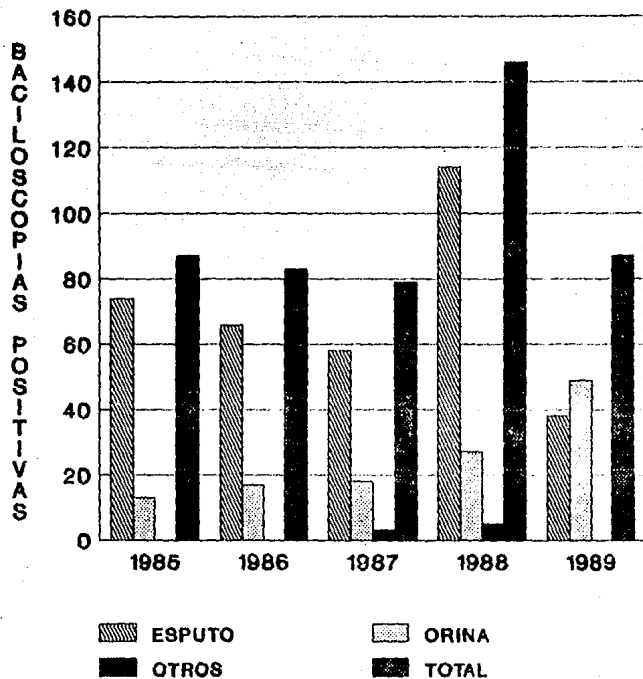


Figura 4

CUADRO 8

PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS DIAGNOSTICADA POR
BACILOSCOPIAS. 1985-1989

| ARO | POBLACION (Adscrita al HGZ-58) | CASOS EXISTENTES (Baciloscopias positivas) | INDICE DE PREVALENCIA |
|------|-----------------------------------|--|--------------------------|
| 1985 | $\bar{X} = 138,901.2$ | 87 | 62.63 |
| 1986 | $\bar{X} = 154,810.2$ | 83 | 53.61 |
| 1987 | $\bar{X} = 155,510.7$ | 79 | 50.80 |
| 1988 | $\bar{X} = 144,853.5$ | 146 | 100.80 |
| 1989 | $\bar{X} = 114,404.25$ | 87 | 76.05 |
| | $\bar{X} = 141,695.97$ | $\bar{X} = 96.4$ | 68.00 |

$$\text{PREVALENCIA} = \left(\frac{\text{Casos existentes (Todas formas, antiguos y nuevos)} \times 100,000}{\text{Población}} \right) \quad (1)$$

PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS

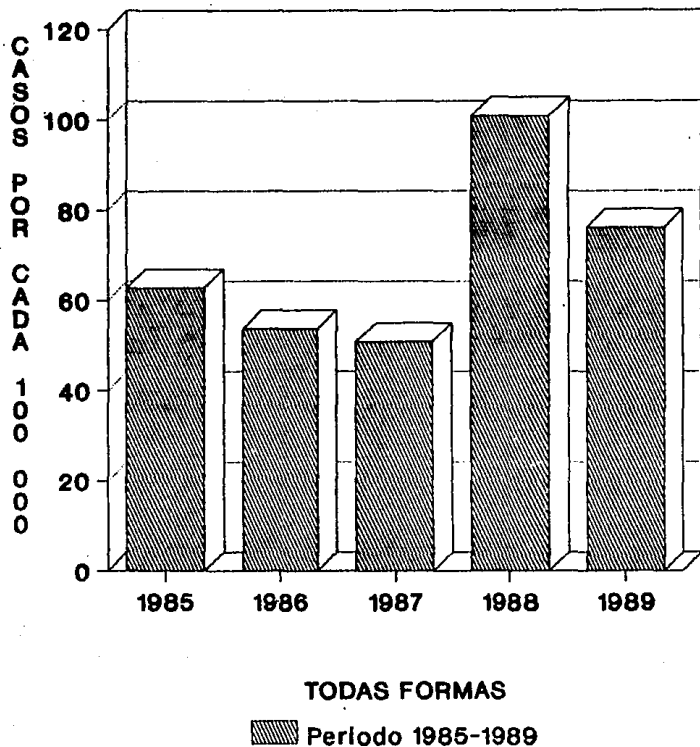


Figura 5

Análisis estadístico.

El Análisis de Varianza fué aplicado a los resultados del estudio comparativo de los métodos: MD y MCD. Las hipótesis consideradas fueron:

H_0 = El Método de Concentración-Descontaminación en la búsqueda de BAAR es igualmente efectivo que el Frotis Directo.

H_3 = Si hay diferencia entre ambos métodos.

Rechace H_0 si F calculada $>$ F de tablas.

CUADRO 7

Comparación entre F calculada y F de tablas:

| | |
|------------------|---|
| a) Tratamientos: | F calculada = 16.39 $>$ F tablas = 4.24 |
| b) Bloques: | F calculada = 7.28 $>$ F tablas = 4.24 |

Para los dos casos se rechaza H_0 y se concluye que hay una diferencia significativa entre ambos métodos a un nivel de significancia de 0.05

6.0 DISCUSION.

En la actualidad se están investigando y mejorando técnicas de diagnóstico rápido de la Tb que lleven a reconocer bacilos intactos, fragmentos bacilares y metabolitos del bacilo, en esputos, tejidos, fluidos: basados en la detección de ácido-resistencia específica, lípidos; aplicando cromatografía de gases, espectrofotometría de masas, resonancia magnética nuclear, electroforesis, inmunoensayos. (6)

La técnica de diagnóstico universalmente empleada es la baciloscopia y constituye el procedimiento estandar en la mayoría de los países en desarrollo. A pesar de ser un instrumento valioso, el organismo debe recuperarse en medio de cultivo para permitir el diagnóstico definitivo.

El método de examen de frotis es el menos sensible para detectar micobacterias pero tiene ciertas ventajas como:

- a) es un procedimiento fácil y rápido para el diagnóstico presuntivo de enfermedad micobacteriana y,
- b) puede emplearse para seguir los progresos en quimioterapia de un paciente tuberculoso conocido. (28)

La confiabilidad de la baciloscopia como procedimiento de diagnóstico está relacionada con la sensibilidad y especificidad de la prueba. La sensibilidad representa el porcentaje de resultados positivos en los individuos que

padecen la enfermedad. La especificidad significa el porcentaje de resultados negativos entre las personas que no la padecen. (21)

En la literatura se han encontrado valores muy variados para las baciloscopías. Moysen en 1984 menciona una sensibilidad del 61% y una especificidad del 97%. (30) Aluoch en 1984 en un estudio en Kenya reportó una sensibilidad de 65% y especificidad de 99.8%. (4) Kim en 1984 encontró que tres frotis de esputo consecutivos dieron una sensibilidad general de 74.4% cuando se valuó contra un cultivo de esputo. (26)

Daniel en 1986 reporta su estudio en Bolivia, con una sensibilidad del 79% y una especificidad del 100%. y para ELISA una sensibilidad de 69% y una especificidad de 88% (12). Este investigador hace notar que el aumento de la sensibilidad puede deberse a que utilizó frotis de muestras de esputo concentradas y procesadas, mientras que otros han usado frotis directo de esputos.

Los resultados de nuestro trabajo están de acuerdo a lo discutido en el estudio de Daniel, T.M., ya que por el Método Concentración-Descontaminación (MCD) se obtuvo un mayor porcentaje de positividad frente al Método Directo (MD) (cuadro 2 y figura 2). Sin embargo cabe aclarar que para el MD no se siguió un rigor metodológico ya que el técnico laboratorista que participó en el MD, no siempre era el mismo por razones

administrativas, teniendo probables deficiencias como la preparación del frotis, coloración, examen inadecuado del frotis, que pudieron haber conducido a obtener resultados falsos negativos.

En México son ampliamente utilizadas las técnicas bacteriológicas para el diagnóstico de la Tb. La Secretaría de Salud con sus tres niveles de atención (S.S.A., I.M.S.S., I.S.S.S.T.E.) constituye la red de laboratorios de microscopía, compuesta por 356 laboratorios. 343 (96.35%) hacen microscopías, 12 realizan microscopías y cultivos y el Laboratorio Central de la Tuberculosis procesa muestras para microscopía, cultivo, pruebas de tipificación y de sensibilidad a las drogas. (31)

En el Boletín Epidemiológico semana 50 de 1989 DGE/SSA, (15), informa que del total de casos de Tb todas formas registrados, el 92.73 por ciento se confirmó por algún método de laboratorio, destacando al respecto, las baciloscopias con el 98.75 por ciento correspondiendo a cultivo 0.56 por ciento y a biopsias 0.69%, según el Registro Nacional de Casos de Tb, DGE/SSA. El número reducido de laboratorios que realizan cultivos en México se manifiesta por los comentarios de Herrera (24) que dicen: "en los programas de Control de Tb la indicación de cultivo se reduce al diagnóstico diferencial o

para confirmar un diagnóstico clínico no definido, por lo que no es justificable el cultivo para el diagnóstico rutinario y masivo de la Tb pulmonar". Lo anterior en base a recomendaciones de la OPS (40) que por experiencias satisfactorias en estudios controlados, se concluye que dos exámenes consecutivos de frotis equivalen por su productividad a un cultivo.

En nuestro trabajo, cuando los frotis presentaron bacilos en número incontable, se confirmó la posibilidad de crecimiento de micobacterias en los cultivos (cuadro 2), ya que existe una correlación positiva entre la concentración de bacilos que se pueden cultivar de las muestras y el número de BAAR en el correspondiente frotis. (13)

El número de cultivos positivos con baciloscopías positivas representados por un 15.6% (cuadro 4 y figura 3), no es lo esperado aunque aceptable. La negatividad en los cultivos puede deberse a factores como:

- a) Los bacilos observados en el microscopio estaban muertos o con metabolismo pobre, ya que en el estudio se incluyeron diversos tipos de enfermos, es decir con diferente diagnóstico: probable Tb (casos nuevos); Control Tb (enfermos en tratamiento, crónicos, recaídas).

- b) Los pacientes no eran bacilíferos.
- c) En ocasiones los pacientes no expectoraban adecuadamente y no se obtenía una buena muestra representativa.
- d) Como se observa en la gráfica A de la figura 3, la mayoría fueron muestras de orina de etiología desconocida y cuyos bacilos observados en el microscopio fueron siempre escasos y con probabilidad de que fuese *M. smegmatis*, micobacteria saprófita (21) que suele encontrarse en las muestras de orina (3).

El porcentaje mayor de cultivos positivos (gráfica B, de la figura 3) fué de origen pulmonar que confirma los estudios que se tienen de que la Tb pulmonar ocupa un mayor porcentaje que la Tb extrapulmonar. En nuestro caso ésta correspondió a Tb renal con un 20% y un 80% para Tb pulmonar, aunque estas cifras no son representativas, los resultados caen en forma aproximada dentro del siguiente cuadro:

CASOS DE TUBERCULOSIS NOTIFICADOS SEGUN LOCALIZACION
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
1980-1988

| LOCALIZACION | 1 9 8 0 | | 1 9 8 4 | | 1 9 8 8 | |
|--------------|---------|-----|---------|--------|---------|--------|
| | CASOS | % | CASOS | % | CASOS | % |
| PULMONAR | 11,165 | 100 | 12,609 | 86.77 | 12,204 | 91.78 |
| MENINGEA | 0 | 0 | 0 | 0 | 145 | 1.09 |
| OTRAS | 0 | 0 | 1,922 | 13.23 | 948 | 7.13 |
| TOTAL | 11,165 | 100 | 14,531 | 100.00 | 13,297 | 100.00 |

FUENTE: Dirección General de Epidemiología/SSA. (15)

En los datos actualizados para 1987, hasta la semana 48 se tenían acumulados 9,472 casos de Tb pulmonar y 65 casos de Tb meníngea, según el Informe Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades, DGE/SSA. (15)

Otro de los objetivos del presente trabajo fué aislar al Género Mycobacterium de las muestras sospechosas. Según se observa en el cuadro 5, la especie aislada en todos los casos fué M.tuberculosis, ya que las micobacterias atípicas son poco frecuentes. En estudio realizado por Blancarte en 1982 sobre Mycobacterias Atípicas en la República Mexicana, de 547 cultivos estudiados, 490 (89.6%) fueron clasificados como M.tuberculosis y 57 (10.4%) correspondieron a micobacterias atípicas. (7)

El estudio de la frecuencia de Tb en el HGZ/MF-58 localizado en la zona Naucalpan-Tlalnepantla-Atizapán de Zaragoza en el Estado de México, arrojó datos interesantes. Los índices de prevalencia encontrados según se observa en el cuadro 8, figura 5, aunque en general no son suficientemente representativos de la población total del Estado de México y no reflejan la morbilidad real, son datos estimativos de la enfermedad.

Las entidades federativas con las cifras de morbilidad más altas para 1988, fueron:

| | |
|------------|-------|
| Chiapas | 40.82 |
| Tabasco | 27.63 |
| Guanajuato | 24.03 |
| Colima | 23.27 |
| Veracruz | 22.54 |

En tanto que las entidades con las tasas más bajas fueron:

| | |
|------------------|------|
| Tlaxcala | 4.70 |
| Guanajuato | 3.42 |
| Aguascalientes | 2.92 |
| Distrito Federal | 2.78 |
| Estado de México | 2.10 |

Estas últimas, con tasas muy por debajo a la registrada para el nivel nacional (9.97 casos de Tb pulmonar por cada 100,000 habitantes. (16)

Los datos actualizados para 1989, hasta la semana 48, reportan 416 casos nuevos notificados de Tb pulmonar y 10 de Tb meningea en el Estado de México. (15)

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

7.0 CONCLUSIONES

- 1) M.tuberculosis constituye un problema epidemiológico.
- 2) La baciloscopia por Z-N es una técnica sencilla, económica y rápida; provee amplia cobertura en la localización de casos.
- 3) La baciloscopia para búsqueda de BAAR es sensible y específica en alto grado.
- 4) Utilizando el MCD se obtiene mayor sensibilidad para esta prueba.
- 5) No es fácil que personal responsable de estos servicios practique con exactitud uniforme el MD. Se propone utilizar el MCD en exámenes de rutina para una confiabilidad técnica óptima.
- 6) Baciloscopías y cultivos son útiles en la interrupción de la cadena de transmisión, detectando fuentes de contagio.
- 7) En suma y en base a lo antes expuesto es evidente que la bacteriología continúa siendo la herramienta básica desde los tiempos de Koch.
- 8) Las cifras de prevalencia, morbilidad y mortalidad nos muestran que la Tb sigue figurando dentro de las principales enfermedades transmisibles.

B.0 BIBLIOGRAFIA.

1. Alcalá, V.L. La tuberculosis pulmonar, Edit. Interamericana. México. 1970 pp 79-170
2. Alix, A.J. Tuberculosis pulmonar en la era antibiótica. Salvat Editores. España. 1979 pp 1-11
3. Allen, B.W. Mycobacteria. Aislamiento, identificación y pruebas de sensibilidad. El Manual Moderno. México 1976 pp 1-65
4. Aluoch, J.A. 1984. Study of case-finding for pulmonary tuberculosis in outpatients complaining of a chronic cough at a district hospital in Kenya. Am. Rev. Respir. Dis. 129:915-20
5. American Thoracic Society. 1986. Treatment of Tuberculosis Infection in Adults and Children. Am. Rev. Respir. Dis. 134:355-363
6. Bates, J.M. 1986. Improvements in the Diagnosis of Tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 134:415-417
7. Blancarte, L.M. 1982. Micobacterias atípicas en la República Mexicana. Salud Pública de México. 24(3): 329-337
8. Blancarte, L.M. 1982. Resistencia primaria del Mycobacterium tuberculosis. Salud Pública de México. 24(3): 321-327
9. Burdon, K.L. Microbiología. Publicaciones Cultural.

- México. 1983 p.p. 12-17, 655-675
10. C.D.C., MMWR. 1988. Use of BCG Vaccines in the Control of Tuberculosis: A Joint Statement by the ACIP and the Advisory ACIP Committee for Elimination of Tuberculosis. JAMA. 260(20):2983-2991
 11. Comité de Expertos de la OMS en Tuberculosis. 1981 Serie de Informes Técnicos 552. OMS. pp 5-12
 12. Daniel, T.M. 1986. Field Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of the Serodiagnosis of Tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 134:662-665
 13. David, .L. 1980. Sensitivity and specificity of acid-fast microscopy. OMS. pp 14
 14. Dhariwal, K.R. 1984. Observations on the Ubiquity of the Mycobacterium tuberculosis Sulfatides in Mycobacteria Am. Rev. Respir. Dis. 130:641-646
 15. Dirección General de Epidemiología/SSA. 1989. Boletín epidemiológico 50. México. pp 1-18
 16. Dirección General de Epidemiología/SSA. 1989. Boletín 17 México. pp 29-31
 17. Doyle, R.J. 1986. Microbes, warfare, religion and human institutions. Can. J. Microbiol. 32:193-200
 18. Edwards, D. 1986. Immunology of Mycobacterial Diseases. Am. Rev. Respir. Dis. 134:1063-1071
 19. Freeman, B.A. Tratado de Microbiología de Burrows.

- Edit. Interamericana. México. 1984 pp 685-711
20. Goren, M.B. 1982. Immunoreactive substances of mycobacteria. Am. Rev. Respir. Dis. 129:50-69
 21. Gradwohl. Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico. Edit. Médica Panamericana. Argentina. 1986 pp 1559-1580
 22. Griffith, D.E. 1988. Environmental Mycobacteria An Increasing Problem. Hospital Practice, pp 125-149
 23. Gross, T.P. 1989. An Outbreak of Tuberculosis in Rural Delaware. Am. Journal of Epidemiology, 129(2):362-371
 24. Herrera, M.C. 1982. Diagnóstico de la tuberculosis pulmonar. Salud Pública de México, 24(3):289-293
 25. Jawetz, E. Microbiología Médica. El Manual Moderno. México. 1983 pp 221-226
 26. Kim, T.C. 1984 Acid-Fast bacilli in sputum smears of patients with pulmonary tuberculosis. Prevalence and significance of negative smears pretreatment and positive smears post-treatment. Am. Rev. Respir. Dis. 129:264-268
 27. Koneman, E.W. Diagnóstico microbiológico. Edit. Médica Panamericana. México. 1989 pp 403-427
 28. Kubica, G.P. Micobacterias. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1986 pp. 1565

29. Manual de Bacteriología de la Tuberculosis. Técnicas y Procedimientos Básicos. Oficina Sanitaria Panamericana. OPS. OMS. 1973
30. Moysen, J.S. 1984. Crítica de la validéz de los métodos de detección y confirmación de la tuberculosis pulmonar como un problema de salud pública. Salud Pública de México, 26(6):546-552
31. Olvera, R.C. 1982. Evaluación del programa de control de la tuberculosis en la República Mexicana. Salud Pública de México, 24(3):313-319
32. Patel, R. 1986. Isolation and Restriction Endonuclease Analysis of Mycobacterial DNA. Journal of General Microbiology, 132:541-551
33. Park, C.H. 1984. Rapid Recovery of Mycobacteria from Clinical Specimens Using Automated Radiometric Technic. Am. J. Clin. Pathol. 81:341-345
34. Sbarbaro, J. 1986. Improving Methods for Preventing Infection of the Uninfected. Am. Rev. Respir. Dis. 134:407-409
35. Schroeder-Krupp. Diagnóstico Clínico y Tratamiento. El Manual Moderno. México. 1989 pp 151-154
36. Secretaría de Salud, SSA. 1989. Tratamiento de la Tuberculosis. México pp 1-16
37. Secretaría de Salud, SSA. 1987. Programa de Prevención

- y Control de la Tuberculosis. México. pp 1-23
38. Songer, J.G. 1981. Methods for selective isolation of mycobacteria from the environment. Can. J. Microbiol. 27:1-7
39. Stites, D.P. Inmunología Básica y Clínica. El Manual Moderno. 1985 pp 632-635
40. Toman, K. Tuberculosis. Detección de Casos y Quimioterapia. Preguntas y Respuestas. Publicación Científica # 392. OPS. OMS. 1980 pp 3-80
41. Valenzuela, MTB. 1985. Técnicas Bacteriológicas en Tuberculosis. Acta Médica FAB. 8(2):49-52
42. Vestal, A.L. Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria. U.S. Department of Health Education and Welfare. CDC. 1978
43. Wang, Y.M. 1986. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Mycobacterium tuberculosis Antigen 5 for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in China. Am. Rev. Respir. Dis. 134:1273-1275
44. Yáñez, A.V. 1989. Bases Bacteriológicas y Farmacológicas del Tratamiento de la Tuberculosis. Guía para el Médico General. SSA. pp 4-7

9.0 A P E N D I C E .TINCIÓN DE ZIEHL-NEELENColoración:

- a) Colocar el frotis ya fijado sobre la varilla.
- b) Cubrirlo con fucsina básica previamente filtrada.
- c) Calentarlo pasándole por el reverso una flama hasta la emisión de vapores durante cinco minutos, evitando la ebullición o la desecación, para lo cual debe reponerse la fucsina que se va consumiendo.
- d) Lavarlo con agua de la llave.

Decoloración:

- a) Cubrir el extendido con alcohol ácido más o menos dos minutos.
- b) Eliminar el alcohol ácido lavando la lámina con agua a baja presión.
- c) Se considera decolorado el extendido cuando sus partes más gruesas conservan sólo un ligero tinte rosado. Esta operación tarda generalmente dos minutos.

Coloración de contraste:

- a) Cubrir la superficie del extendido con azul de metileno durante un minuto.
- b) Lavar el portaobjetos con agua a baja presión, tanto por la superficie del extendido como por su cara inferior.

c) Secar la lámina ya teñida a temperatura ambiente.

Preparación de reactivos (para 1000 ml)

a) Fucsina fenicada:

Fucsina básica 3 g.
Alcohol etílico 95° 100 ml.

Disolver por agitación en un matraz aforado, agregando lentamente el alcohol; agregar 55 ml de fenol acuoso (100 g. de fenol en cristales, más 10 ml. de agua destilada; calentar en baño maría hasta disolución completa y enfriar). Agitar y agregar agua destilada hasta completar 1000 ml. Dejar reposar 24 hrs. y filtrar.

b) Azul de Metileno:

Azul de metileno 1 g.
Alcohol etílico 95° 100 ml.

Disolver por agitación y agregar agua destilada hasta completar 1000 ml. Filtrar.

c) Solución decolorante:

Acido Clorhídrico 30 ml.
Alcohol etílico 95° 970 ml.

Dejar escurrir lentamente el ácido clorhídrico por las paredes del matraz que contiene el alcohol. agitar suavemente.

Referencia: Manual de Bacteriología de la Tb.
Técnicas y procedimientos básicos.
Oficina Sanitaria Panamericana.
OPS-OMS, 1973

TECNICA DE HOMOGENIZACION Y DESCONTAMINACIONMETODO DE PETROFF.

- 1) Colocar en cada tubo con tapa de rosca, 2 ml. de la muestra. En el caso de muestras centrifugadas se emplea todo el sedimento. Flamear en la llama los bordes de los tubos.
- 2) Agregar a cada tubo NaOH al 5% con rojo de fenol incorporado (0.04%), en igual volumen al de la muestra; ajustando firmemente la tapa del tubo.
- 3) Si se cuenta con equipo mecánico tipo "vortex" agitar los tubos 20 segundos antes de incubar a 37°C durante 15 minutos. Si se dispone de un agitador de Kahn, colocar los tubos en movimiento constante durante 15 minutos a 37°C. Terminada la incubación centrifugar 3000 rpm, durante 15 minutos.
- 4) Eliminar cuidadosamente el sobrenadante en un dispositivo a prueba de salpicaduras que contenga fenol al 5%
- 5) Neutralizar el sedimento con ácido clorhídrico al 3% (para que el cambio de pH no sea brusco). El proceso de neutralización debe ser muy cuidadoso de manera que el pH no sea menor de 6.5 ni mayor de 7.2

Ref: (29)

REDUCCION DE NITRATOS

Substrato: Nitrate de sodio M/100 en buffer de fosfatos
M/45, pH 7.0 preparado como sigue:

| | |
|---|----------|
| NaNO ₃ | 0.170 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.234 g |
| Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O | 0.970 g |
| H ₂ O destilada | 200.0 ml |

Reactivo:

- Dilución 1:1 de HCl concentrado (adicionar 10 ml de HCl a 10 ml. de H₂O).
- Disolver 0.2 g de sulfanilamida en 100 ml. de agua.
- Disolver 0.1 g de diclorhidrato de n-naftiletilen-diamina en 100 ml. de agua destilada.

Conservar los reactivos y el substrato en frascos ámbar en el refrigerador.

Organismos de control: M.tuberculosis H37R: fuertemente (+)

M.kansasii: débilmente positivo

M.intracellulare: negativo

Procedimiento:

- Colocar 3 ó 4 gotas de agua destilada estéril a cada tubo de prueba.
- Emulsionar una asada de colonias del medio sólido de cultivo.

- 3) Añadir 2 ml. del substrato NaN_2O a cada tubo con la emulsión.
- 4) Agitar manualmente para mezclar e incubar a 37°C durante dos horas; retirar.
- 5) Añadir a cada tubo una gota del reactivo # 1 y mezclar agitando manualmente el tubo.
- 6) Añadir dos gotas del reactivo # 2
- 7) Añadir dos gotas del reactivo # 3

Resultados:

Si desarrolla un color rojo, la prueba es positiva. Este cambio de color puede variar de rosa a rojo intenso.

Comparar los resultados con estandares de color y reportar de + a 5+, de acuerdo a la intensidad del cambio de color.

Fuente: Vestal, Annie L., Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria. U.S. Department of Health, Education and Welfare. CDC. 1978

PRUEBA DE LA NIACINA.Reactivos:

- a) Anilina al 4%

A 96 ml. de etanol al 95% adicionar 4.0 ml. de anilina incolora.

- b) Bromuro de cianógeno al 10%

Disolver 5 g. de bromuro de cianógeno en 50 ml. de agua destilada.

Procedimiento:

- a) Se toma un tubo de cultivo que tenga abundantes colonias desarrolladas sobre el medio de Lowenstein-Jensen.
- b) Se le agrega 0.5 ml. de agua destilada estéril y se coloca en posición casi horizontal, de modo que el agua bañe la totalidad de las colonias; la niacina presente en las colonias se disolverá en el agua en 5 a 10 minutos.
- c) Se traspasa 0.5 ml. de agua destilada que ha extraído la niacina a un tubo pequeño y se le agrega 0.5 ml. de una solución de anilina al 4% y 0.5 ml. de bromuro de cianógeno al 10%

Cada vez que se efectúe esta prueba es conveniente tener una cepa H37Rv u otra conocida como niacina positiva con el objeto

de hacer también en esas colonias la prueba para controlar la calidad de los reactivos. Además se debe hacer una prueba con agua destilada como control negativo.

El líquido tomará casi inmediatamente color amarillo si existe suficiente niacina (M. tuberculosis) o permanecerá incoloro si la niacina es insuficiente (M. bovis u otras micobacterias).

Fuente: (29)

CATALASA pH 7/68°CReactivos:

1. Tween-peróxido:

Peróxido de hidrógeno 30%; Tween 80, 10%. Mezclar volúmenes iguales en cantidad necesaria en el momento de utilizar.

2. Buffer de Fosfatos M/15, pH 7.0:

- | | |
|--|------------|
| a) Na_2HPO_4 anhidro | 9.47 g |
| Agua destilada: | 1000.00 ml |
| b) Fosfato de potasio KH_2PO_4 | 9.07 g |
| Agua destilada: | 1000.00 ml |

Mezclar 61.1 ml. de solución (a) con 38.9 ml. de solución (b)

Procedimiento:

- 1) Numerar los tubos con tapón de rosca que correspondan a los cultivos que van a probarse.
- 2) Con una pipeta estéril, añadir 0.5 ml. de buffer de fosfatos pH 7 a cada tubo.
- 3) Con una asa estéril, emulsionar en el buffer varias colonias del cultivo.
- 4) Colocar los tubos con las colonias emulsionadas en baño de agua o estufa caliente a una temperatura de 68°C durante 20 minutos.

NOTA: El tiempo y la temperatura son importantes.

- 5) Retirar y enfriar a temperatura ambiente.
- 6) Añadir a cada tubo 0.5 ml. de la mezcla tween-peróxido.
- 7) Observar en la superficie del líquido la formación de burbujas. Retener los tubos durante 20 minutos antes de descartarlos como negativos.

Resultados:

Formación de burbujas: positiva

No formación de burbujas: negativa.

Fuente: (29, 42)