

56

UNAM

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES " ZARAGOZA "

COINTIA ROJAS LABRA

Nº DE CUENTA: 9453586-0

ORIENTACIÓN: BIOQUÍMICA CLÍNICA

TITULO

**CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *M. TUBERCULOSIS* EN
LÖWENSTEIN- JENSEN ESTABLECIDA POR REDUCCIÓN DE
NITRATOS**

AÑO DE TÉRMINO DE LA CARRERA: 2001

DIRECTOR DE TESIS: NÉLIDA RUTH PARRA MALDONADO

ASESOR DE TESIS: JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO

ÁREA DEL PROYECTO: BACTERIOLOGÍA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

LUGAR DONDE SE DESARROLLA EL TRABAJO EXPERIMENTAL

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA DE ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y PARASITARIAS**

HOSPITAL DE PEDIATRIA

CENTRO MÉDICO SIGLO XXI



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	3
SITUACIÓN MUNDIAL.....	4
SITUACIÓN EN MÉXICO.....	5
PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS DE LA BACTERIA.....	6
DIAGNÓSTICO.....	7
CONTROL DE CALIDAD DEL MEDIO Löwenstein-Jensen.....	10
LA REACCIÓN DE REDUCCIÓN DE NITRATOS EN EL GÉNERO MYCOBACTERIUM.....	12

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
HIPÓTESIS.....	17
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	18
MATERIAL.....	19
DIAGRAMA DE FLUJO.....	21
MÉTODOS.....	22
DISEÑO ESTADÍSTICO.....	28
RESULTADOS.....	29
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIÓN.....	54
RECOMENDACIÓN.....	55
ANEXOS.....	56
GLOSARIO Y ABREVIATURAS.....	61
BIBLIOGRAFIA.....	62

*Este trabajo se realizó en la unidad de Investigación
Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, del
Hospital de Pediatría en el Centro Médico Nacional
Siglo XXI.*

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a mis padres; Martha Labra y Felipe Rojas, y les doy gracias por su apoyo incondicional en todo momento, por su cariño comprensión y sacrificios y sobre todo por su gran ejemplo de lucha.

Doy gracias a mis hermanos Lizbeth, Ismael, Anayeli, Crisol, Felipe, por estar siempre conmigo apoyándome.

Agradezco a la M. en C. Nélida Ruth Parra Maldonado, por darme la oportunidad de aprender y compartir su experiencia y enseñanza, de la cual estaré por siempre agradecida.

Agradezco el apoyo brindado por el Dr. Torres y la Q.B.P. Teresa Álvarez así como a todos los que laboran en la unidad de investigación en el Hospital de pediatría.

Agradezco al Q.F.B. José Oscar Gonzáles Moreno, por su apoyo y grato asesoramiento en este trabajo.

Agradezco ala Dra. Adelina, y ala Q.F.B Rosa María Palomino por su amistad y apoyo así como sus buenos consejos.

Doy gracias a mi compañera y amiga María Engracia, por su apoyo y su gran amistad.

RESUMEN

"Cinética de crecimiento de *M. tuberculosis* en Löwenstein – Jensen establecida por reducción de nitratos"

La realización de este trabajo fue impulsado por la necesidad de evaluar la aptitud de los lotes de medio Löwenstein – Jensen para el desarrollo *M. tuberculosis* H37 Rv ATCC 27294 y obtener resultados en períodos de tiempo cortos.

En 1975 García Rojas Leticia realizó ensayos de viabilidad de lotes de vacuna BCG de forma paralela por cuenta viable e indirectamente por cuantificación de la actividad nitrato reductasa presente en los bacilos metabólicamente activos técnicas que demostraron una alta correlación de ahí que la actividad enzimática es útil para demostrar los cambios poblacionales de un cultivo de *M. tuberculosis* en Löwenstein – Jensen.

El objetivo del presente trabajo fue establecer, las condiciones óptimas para apreciar la cinética de crecimiento de *M. tuberculosis* en el medio de Löwenstein – Jensen por reducción de nitratos.

La dispersión bacteriana más satisfactoria se logró por la metodología de preparación de la suspensión bacilar del método de drogasensibilidad de las proporciones de Cannetti Rist y Grosset.

El ajuste de turbidez de la suspensión bacteriana, tubo # 1 Mc Farland, se realizó por nefelometría a 580nm (0.256-0.302 abs), que corresponde a 3×10^7 bac/mL, considerada como la "suspensión madre".

El inóculo que permitió, seguir la cinética de crecimiento de *M. tuberculosis* fue 0.1 mL de una dilución 1:100 de la "suspensión madre".

El desarrollo de color por la presencia de nitritos fue creciente y proporcional al número de bacilos presentes en la reacción, en una progresión de 6×10^6 bac/mL hasta 48×10^6 bac/mL.

El tiempo óptimo para la demostración de los nitritos se estableció por ensayos en periodos de 5-60 minutos, seleccionando el de 15 minutos, por su mayor reproducibilidad.

De acuerdo a los tiempos de generación de **M.tuberculosis** de aproximadamente 20 horas, los incrementos de población de **M.tuberculosis** se midieron por reducción de nitratos, en días sucesivo del 1° hasta el día 12, lo que permitió observar que del día 1 al 4 no se manifiesta incremento alguno de la población (fase de adaptación), en tanto que en los días 5 al 8 hay una diferencia significativa de población (fase de crecimiento logarítmica).

La técnica de reducción de nitratos para cuantificar la presencia de bacilos **M.tuberculosis** en medio Löwenstein – Jensen presenta una sensibilidad de 90%, una especificidad 88% y un valor de corte de Incremento Poblacional ≥ 2.1 , con respecto al estándar de oro que es la cuenta viable.

De acuerdo a los resultados de la cinética de crecimiento de **M.tuberculosis** en Löwenstein – Jensen se comprobó que las condiciones óptimas fueron el inóculo de 3×10^4 bac/mL en un tiempo de incubación de los cultivos del día 5 al 8.

El ensayo enzimático de reducción de nitratos podría ser útil para evaluar los incrementos de población de **M.tuberculosis** en Löwenstein – Jensen con un ahorro importante de tiempo.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

A principios del siglo XIX los trabajos de los médicos franceses Gaspart Laurent Bayle y René Laënc establecieron las formas y estadios de la tuberculosis como enfermedad; ambos fallecieron por su causa. El microbiólogo alemán Robert Koch descubrió el agente causal, el bacilo tuberculoso, en 1882. En 1890, desarrolló la prueba de la tuberculina para el diagnóstico de la enfermedad. En 1924, los bacteriólogos franceses Albert Léon Calmette y Alphonse F.M. Guérin desarrollaron una vacuna denominada BCG (Bacilo de Calmette-Guérin)^{3,7}.

El primer agente quimioterápico específico para la tuberculosis fue la estreptomycin, descubierta por el microbiólogo norteamericano Selman Abraham Waksman en 1944^{9,11}.

Este descubrimiento fue seguido en 1948 por el del PAS (ácido para - amino salicílico) y más tarde por la isoniazida y otros fármacos que revolucionaron el tratamiento de la tuberculosis^{3,2}.

La estrategia de quimioterapia vigente usa cuando menos 3 o 4 drogas a fin de evitar la selección de cepas resistentes, así como de garantizar la acción específica de los antimicrobianos en las distintas poblaciones de micobacterias; pero de todos los antimicrobianos, se dan casos de drogoresistencia por fallas del tratamiento^{3,2}.

Por otro lado los pacientes con SIDA son particularmente sensibles a enfermar de tuberculosis, por esta y otras razones la tuberculosis continúa siendo un grave problema de salud pública en el mundo, y México no es una excepción⁵.

SITUACIÓN MUNDIAL

Este padecimiento fue declarado emergencia mundial por la Organización Mundial de la Salud en 1993 y es la primera causa de muerte producida por un solo agente patógeno a nivel mundial. Hasta la década de los ochenta, la tasa de incidencia de casos de tuberculosis disminuyó en México; había presentado una tendencia a disminuir sin embargo, a partir de entonces la frecuencia ha aumentado⁹.

La distribución de la tuberculosis es mundial y se calcula que hay una prevalencia de 16 millones de casos, de los cuales 8 – 10 millones son casos nuevos cada año, 25% de la población mundial ha sido infectada en alguna etapa de su vida y cada año mueren por este problema 3 millones de personas. La enfermedad predomina en países pobres, mal saneados y con desnutrición prevaleciente²⁶.

En ciertas regiones, la quimioterapia, el mejoramiento de las condiciones de salud y probablemente la vacunación con BCG, lograron reducciones significativas en su incidencia, prevalencia y mortalidad².

Es la infección humana con más casos y muertes al año (8.4 y 3 millones respectivamente); en mujeres ocasiona más muertes que las causas maternas en algunos países son la principal causa de orfandad.

Debido al VIH/SIDA, a la farmacoresistencia y al poco impacto de las acciones de control en algunos países es un problema de salud pública, en México es endémica y no se considera reemergente²⁶.

La tuberculosis es uno de los principales problemas de salud pública mundial. Por este motivo, para el año 2000 la OMS se propuso "curar el 85% de los casos nuevos con baciloscopia positiva y detectar el 70% de los casos existentes" ¹³.

SITUACIÓN EN MÉXICO

Las acciones dirigidas a controlar la tuberculosis y sus consecuencias, han existido en México desde que esta enfermedad se identificó como un padecimiento epidemiológicamente importante^{13,7}.

Actualmente, las acciones se organizan en un Programa Nacional dependiente de la Secretaría de Salud que aplican todas las instituciones del Sistema Nacional de Salud y al que se le da seguimiento a través de un grupo interinstitucional²⁶.

La situación en México; Desde los años cincuenta la mortalidad por tuberculosis pulmonar ha descendido considerablemente, sin embargo, en 1999 aún ocupaba el lugar decimoquinto como causa de muerte con 3.3 defunciones por 100,000 habitantes, entonces era la segunda causa de muerte debida a un solo agente infeccioso. La morbilidad mostró una tendencia ascendente de 1994 a 1997, se aprecia un incremento del 24% en el número de casos de tuberculosis pulmonar y en las tasas de morbilidad al pasar de 14.0 a 18.7 casos por cada 100, 000 este último año con 19, 577 casos (19.6 por 100,000 habitantes), desde 1998 se ha presentado una ligera reducción.

En 1999 aún ocupaba el lugar decimonoveno como causa de muerte y en el año 2000 se reportaron 15, 781 casos²⁶, la población más afectada es la económicamente activa¹³.

Durante el año 2000 se registraron 15 649 casos de tuberculosis pulmonar, los estados con incidencias mayores fueron Tamaulipas, Baja California, Guerrero, Veracruz, Nuevo León, Nayarit, Sinaloa, Tabasco, Chiapas y Colima ,el estado con la mortalidad más alta desde hace 10 años en el país ha sido Chiapas.²⁶

PROPIEDADES Y CARACTERÍSTICAS DE LA BACTERIA

El bacilo tuberculoso es un bacilo aerobio estricto que requiere presiones parciales de oxígeno entre 120 y 140 mm de Hg, con temperatura de crecimiento entre 35-37°C, pH de 6.7 a 6.9, nutrientes, humedad moderada y oscuridad, posee una pared celular de lípidos cerosos que le confiere la característica de ácido-alcohol-resistente (BAAR), es delgado, ligeramente curvo, mide de 0.8 a 5 μ de longitud y cerca de 0.2 a 0.6 μ de grosor, no esporulado, e inmóvil. Su tiempo de generación es prolongado, de 18-20 hrs y la aparición de macrocolonias es de 10 a 12 días^{12, 5}.

Las cepas virulentas tienden a orientarse en cordones serpentinos, produce catalasa en cantidades moderadas pero no después de calentar a 68°C por 20 minutos en un amortiguador de pH 7; las cepas humanas resistentes a la isoniazida son frecuentemente catalasa negativa y dan colonias lisas en medio de huevo coagulado. Reducen los nitratos, la mayoría de las cepas son niacina positiva.¹

La tuberculosis causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, es la enfermedad más antigua que ha padecido el hombre, la forma pulmonar es la de mayor importancia por su frecuencia y capacidad de transmisión, un caso no tratado puede infectar de 10 a 15 personas; ***M. tuberculosis***, puede afectar a cualquier tejido del organismo pero primordialmente a pulmones⁷. El nombre de tuberculosis deriva de la formación de unas estructuras celulares características denominadas tuberculomas, donde los bacilos quedan encerrados.

La enfermedad no suele aparecer en animales en su hábitat natural pero si puede afectar al ganado vacuno, porcino y avícola².

DIAGNÓSTICO

Es importante mencionar que los resultados de las pruebas de laboratorio deben correlacionarse con la historia clínica del paciente, lo cual permite minimizar el daño potencial al paciente por un mal diagnóstico.

El diagnóstico absoluto de tuberculosis consiste en la recuperación por medio del cultivo de las especies del complejo ***M. tuberculosis*** a partir de muestra clínicas.

La baciloscopia consiste en la visualización de bacilos ácido-alcohol resistente por medio de la coloración de Ziehl-Neelsen⁵ o microscopia fluorescente. Es una herramienta irremplazable para la detección de los casos infecciosos de tuberculosis, ya que permite actuar rápidamente: aislar al paciente, instaurar el tratamiento específico, tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES), controlar a los contactos y monitorear el tratamiento.

La sensibilidad de los métodos diagnósticos depende del número de bacilos presentes en la muestra por este motivo, la **microscopía** de esputo es muy útil en la detección de los casos avanzados de tuberculosis pulmonar (5000 a 10,000 bac/mL), pero no para los casos de tuberculosis pulmonar inicial, o en los casos de tuberculosis infantil y extrapulmonares.

La presencia del morfotipo BAAR no permite la diferenciación entre las distintas especies de micobacterias; sin embargo, en localidades geográficas donde la incidencia de micobacteriosis es baja, como ocurre en nuestro país, especialmente en pacientes inmunocompetentes, la microscopía tiene una alta especificidad para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar.

El **cultivo**, además de ser más sensible que la baciloscopia, (10 bac/mL de muestra) proporciona el aislado en el cuál se puede realizar la diferenciación de las especies y la realización de las pruebas de sensibilidad a los

antimicrobianos, así como la de técnicas de caracterización génica aplicables en vigilancia epidemiológica molecular².

Los métodos convencionales de cultivo utilizan distintos medios ya sean sólidos o líquidos. La demostración de la presencia de las micobacterias es por la aparición de colonias en los medios sólidos y la turbidez en los medios líquidos, como la mayoría de las micobacterias de importancia clínica son de crecimiento lento, el inconveniente de estos métodos radica en la prolongada espera para obtener resultados en el diagnóstico.

Existen sistemas que permiten disminuir el tiempo necesario para la detección de micobacterias por cultivo son: sistemas visuales, semiautomatizados o automatizados de lectura precoz, que determinan la multiplicación del bacilo por aumento del consumo de O₂ o producción de CO₂ estos equipos pueden ser radiométricos, colorimétricos o fluorométricos.

El mayor inconveniente de estos métodos es que, por su elevado costo, son de difícil implementación en países en desarrollo, que son los que tienen más alta prevalencia de tuberculosis.

El BACTEC 460 es un equipo para el método radiométrico que tiene una gran sensibilidad y rapidez en la detección de casos. Sin embargo, presenta algunas desventajas con respecto a los otros métodos de lectura precoz: utiliza elementos radioactivos, no es automatizado –con el consiguiente aumento de la carga de trabajo– y emplea una técnica de lectura invasiva que posibilita la contaminación cruzada. En los sistemas no radioactivos, la recuperación y el tiempo de detección es similar, pero tienen la ventaja de ser automatizados y de lectura no invasiva, disminuyendo el riesgo de contaminaciones cruzadas; tienen la desventaja de no estar estandarizados para realizar pruebas rápidas de sensibilidad. Para lograr una mayor recuperación de micobacterias, se recomienda la utilización simultánea de medios de cultivo sólidos y líquidos.

La radiografía simple de tórax es un método de exploración selectiva de la población para evidenciar la tuberculosis pulmonar. Aunque la radiografía suele demostrar la presencia de una lesión pulmonar, la confirmación de su etiología requiere otras pruebas.

La prueba de la tuberculina consiste en inyectar en la piel el derivado proteico purificado obtenido de cultivos de bacilos tuberculosos. Una reacción cutánea positiva indica el reconocimiento de los antígenos de ***M.tuberculosis***, como respuesta a una infección activa o pasada.

El diagnóstico de la enfermedad activa se realiza mediante el aislamiento de bacilos tuberculosos en el esputo. En las fases tempranas no suelen existir síntomas. En la fase avanzada los síntomas comunes a todas las formas de tuberculosis incluyen fiebre, fatiga, sudoración nocturna, pérdida de apetito y pérdida de peso. En la tuberculosis pulmonar estos síntomas se acompañan de trastornos respiratorios como tos, dolor torácico y esputos sanguinolentos⁹. El programa de prevención y control esta centrado en el Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES).

CONTROL DE CALIDAD DEL MEDIO

Löwenstein-Jensen

La calidad se ha convertido en una política de empresa y representa uno de los factores estratégicos de éxito en la actualidad. Esta forma de proceder se denomina Aseguramiento de la Calidad.

- Excelencia en la calidad de servicios investigaciones y docencia
- Disminución de gastos, que deberá traducirse en mayores utilidades.
- Confiabilidad en resultados obtenidos

La calidad del laboratorio en el desempeño analítico de una determinada técnica se define como:

La capacidad de realizar el procedimiento correcto, hacerlo bien y satisfacer al cliente.

Todos los sistemas de salud están ante la necesidad de afrontar el doble reto de trabajar con recursos financieros limitados y de que las expectativas del usuario y del gobierno van en aumento⁴⁸.

Se espera que el personal de laboratorio utilice los recursos del laboratorio efectivamente y produzca resultados del laboratorio de alta calidad.

El laboratorio comprende tres componentes principales: la estructura, el proceso y el resultado, en donde la calidad en cada uno de estos componentes es fundamental²⁰.

Para el diagnóstico bacteriológico de tuberculosis el estándar de oro es el cultivo y por esta razón es necesario evaluar la calidad del medio de cultivo mediante la "promoción para el desarrollo" de *M.tuberculosis*, y así disponer de datos numéricos que nos permiten avalar el conjunto de características que se unen para garantizar la sobrevivencia y duplicación satisfactoria de los bacilos hasta llegar a la formación de colonias.

La realización de control de calidad en medio Löwenstein-Jensen, se ha encontrado reportado en pocas bibliografías, pero el InDRE realiza control de calidad por cuenta viable basados en el Protocolo del Centro de Referencia de Buenos Aires Argentina.

Existe reportado en la bibliografía que el medio de cultivo tiene caducidad de 1 mes³⁴, y para realizar cuenta viable se requiere de 5 a 8 semanas.

LA REACCIÓN DE REDUCCIÓN DE NITRATOS EN EL GÉNERO MYCOBACTERIUM

Bastarrachea estableció que las Mycobacterias poseen la propiedad de reducir el nitrato a nitrito y esta reacción es catalizada por la enzima nitrato reductasa, el nitrito producido puede ser medido por un método simple y la reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



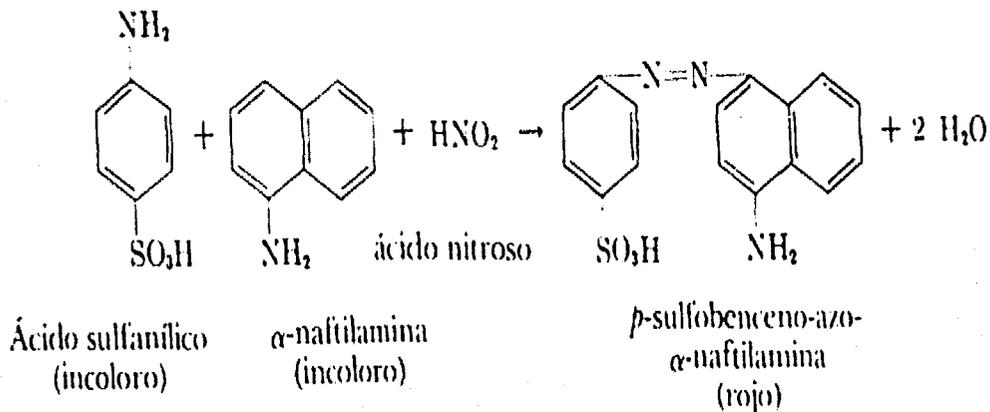
Esta prueba ha sido usada ampliamente para la clasificación de las diferentes especies de micobacterias. Como por ejemplo Herbert y Bachmann mencionan que *M.tuberculosis* y *M.kansaii* dan una reacción fuerte.

Showe y Demos demostraron también la naturaleza particulada de la enzima nitrato reductasa en otros microorganismos, así mismo también mencionan la presencia de un metal unido a la enzima (molibdeno). Bonicke y otros investigadores mencionan que para la reducción enzimática del nitrato por las micobacterias se requiere la presencia de compuestos que sirvan como donadores de electrones. Klauss Jetschann observó que en los medios enriquecidos con huevo, la actividad de la enzima nitrato reductasa aumenta, posiblemente debido a que los lípidos que contienen el huevo actúan como donadores de electrones²⁵.

Por estas investigaciones realizadas con anterioridad podemos fundamentar que la reacción de reducción de la enzima nitrato reductasa presente en *M.tuberculosis* es útil para demostrar indirectamente la viabilidad de la bacteria, ya que el medio de cultivo Löwenstein-Jensen favorece la reacción por ser donador de electrones y por que contiene inhibidores para hacerlo selectivo y evitar el crecimiento de otras bacterias contaminantes.

La reducción del nitrato (NO_3^-) en nitrito (NO_2^-) está indicada por la aparición de color cuando el nitrito reacciona con los dos reactivos: ácido sulfanílico y α -naftilamina (o dimetil- α -naftilamina). La reacción de color resultante se debe a la formación de un compuesto diazoico *p*-sulfo-benceno-azo- α -naftilamina. El enlace del grupo azo $-\text{N}=\text{N}-$ da como resultado un compuesto coloreado por medio de una reacción.

El colorante diazoico se forma por acoplamiento a través de un enlace azo de una amina aromática con un compuesto de tipo fenólico, por lo general en la posición *para* de un grupo oxhidrilo (OH) o amino (NH_2), En este caso el acoplamiento se produce en la posición *para* de un grupo amino³⁹.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis es un problema de salud pública mundial, enfermedad constante en países en vías de desarrollo que sigue causando tasas de mortalidad altas, en México, se reportan de 3.3 defunciones por 100,000 habitantes¹³.

En los países industrializados es una infección reemergente generada por los emigrantes de países con alta incidencia y por el incremento de enfermedades que ocasionan inmunodeficiencia: diabetes, SIDA y terapia inmunosupresora.

El laboratorio representa gran importancia porque realiza la confirmación bacteriológica de la tuberculosis, dentro de las posibilidades diagnósticas que maneja el laboratorio es el cultivo el que permite la recuperación de las micobacterias a partir de muestras clínicas y esta técnica constituye el estándar de oro^{2,6}.

En la actualidad, con el fin de lograr resultados en períodos más cortos que los requeridos para la recuperación de colonias en el medio de Löwenstein – Jensen se han diseñado una serie de sistemas que utilizan medios líquidos para demostrar la presencia de las bacterias por la actividad metabólica. Son sistemas visuales, semiautomatizados o automatizados de lectura precoz, que manifiestan la multiplicación del bacilo por el consumo de O₂ o por la producción de CO₂, estos equipos pueden ser radiométricos, colorimétricos, o fluorométricos^{9,11}.

Si bien son múltiples las opciones de cultivar las especies del género ***Mycobacterium*** son dos aspectos los que mantienen el interés por el medio Löwenstein – Jensen:

- El costo:

Todos los medios de cultivo líquidos industrializados son bastante más caros por ejemplo un frasco de medio 12B cuesta aproximadamente seis veces más que un tubo de Löwenstein – Jensen, por lo mismo son de poca aplicación en países de alta incidencia y bajos recursos económicos.

- La recuperación:

Los mejores índices de recuperación se obtienen al inocular paralelamente dos medios de cultivo un sólido Löwenstein – Jensen y un líquido.

El medio de Löwenstein – Jensen, tiene una formulación que rinde buenos resultados dependiendo de la calidad de la materia prima, los reactivos químicos que se utilizan son de calidad analítica; pero el producto biológico “huevo”, que contiene no es de calidad constante, también es importante contar con un equipo en buenas condiciones y realizar con calidad cada uno de los pasos a seguir de la técnica estandarizada para realizar el medio.

La metodología apropiada para demostrar la calidad de un medio de cultivo en general se fundamenta en la **promoción del desarrollo**, por el ensayo de cuenta viable pero ***M.tuberculosis***, que presenta un tiempo de generación tan prolongado como 18-24 horas, los resultados se obtienen en tiempos inoperantes para el control de calidad⁴¹.

De ahí que sea importante contar con un método alternativo indirecto enzimático para demostrar la cinética de crecimiento de ***M.tuberculosis*** en Löwenstein – Jensen establecida por reducción de nitratos y así poder valorar la promoción del desarrollo de ***M.tuberculosis*** en tiempos más cortos que los necesarios para cuenta viable.

OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones óptimas para demostrar el desarrollo de ***M.tuberculosis*** en Löwenstein-Jensen mediante la actividad enzimática de nitrato reductasa minimizando el tiempo para la identificación.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el tamaño óptimo del inóculo para realizar la cinética de crecimiento de ***M.tuberculosis***.
- Demostrar la proporcionalidad directa entre absorbancia y nitritos presentes como producto de la reducción de nitratos realizada por ***M.tuberculosis***.
- Determinar el tiempo óptimo de desarrollo de color en la reacción de nitritos.
- Demostrar la viabilidad de ***M.tuberculosis***, en los inóculos por BACTEC 460.
- Establecer los tiempos óptimos para manifestar el incremento de la población de ***M.tuberculosis***, por medio de la reducción de nitratos.
- Demostrar la cinética de crecimiento de ***M.tuberculosis*** en Löwenstein-Jensen por reducción de nitratos.
- Comparar reducción de nitratos contra cuenta viable.

HIPÓTESIS

El diagnóstico tradicional de la tuberculosis se realiza mediante el cultivo en medio Löwenstein-Jensen, el cual tiene una sensibilidad del 70 % al 90% ², y demora de cuatro a ocho semanas en obtener resultados.

El medio de L-J es un medio de cultivo complejo de calidad variable que requiere de un método de evaluación en un tiempo reducido y posiblemente las pruebas enzimáticas pueden resolver esta necesidad.

La actividad metabólica de *M. tuberculosis* como la de nitrato reductasa permitirá demostrar la cinética de crecimiento en tiempos más cortos que la técnica de cuenta viable.

DISEÑO DEL ESTUDIO

TIPO DE ESTUDIO:

Experimental prospectivo y longitudinal

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Cultivo de *M.tuberculosis H37Rv* Colección ATCC 27294

Cultivo de 3 semanas y buen desarrollo

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Cultivos con escaso desarrollo a las 3 semanas

VARIABLES INDEPENDIENTES:

Concentración del inóculo a utilizar

VARIABLES DEPENDIENTES:

Concentración de nitrato

PARÁMETROS CONSTANTES:

Tiempo de lectura

Tiempo de incubación

MATERIAL Y METODO

➤ MATERIAL

- ✓ Cultivo de 3 semanas de incubación de **M.tuberculosis H37Rv # 27294.**
- ✓ Medio de cultivo Löwenstein-Jensen (L-J).
- ✓ Medio Middlebrook 7H12 (12B)

▪ REACTIVOS

- ✓ NaOH al 2%
- ✓ Regulador de fosfatos M/15 pH 6.8 estéril
- ✓ Regulador de fosfatos M/45 pH 7 estéril
- ✓ Fenol al 5%
- ✓ HCl concentrado
- ✓ Clorhidrato de n-naftiletildiamina al 0.1%
- ✓ Sulfanilamida al 0.2%
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Equipo para tinción Ziehl Neelsen
 - Carbofucsina fenicada
 - Alcohol – ácido
 - Azul de metileno

■ EQUIPO

- ✓ Campana de bioseguridad: NUAIRE, clase II tipo A/B3 modelo No. Un -440-400
- ✓ Agitador Fisher Vórtex Genie 2 cat No 12-812
- ✓ Espectrofotómetro: Jenway 6405 UV LAB- TECH
- ✓ Microscopio: Carl – Zeiss K7D
- ✓ Balanza: analítica Scientech, S A 210
- ✓ Instrumento Bactec TB 460: system Becton Dickinson, Johnston Laboratorios.

DIAGRAMA DE FLUJO

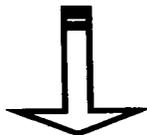
ESTANDARIZACIÓN
DE LA SUSPENSIÓN BACILAR
POR NEFELOMETRÍA
(TUBO #1 Mc FARLAND)
(abs 0.256 -0.302)



CURVA BASAL DE LA REDUCCIÓN
DE NO₃ DE *M.tuberculosis*
Vs ABSORBANCIA



TIEMPOS ÓPTIMOS
DE DESARROLLO
DE COLOR EN LA Rx DE REDUCCIÓN DE NO₃



CUENTA VIABLE Vs ABSORBANCIA



INTERPRETACIÓN
DE RESULTADO

➤ MÉTODOS

CURVA PATRÓN CONCENTRACIÓN CONOCIDA DE NITRITOS Vs ABSORBANCIA

1. Realizar una solución de NaNO_2 a una concentración de $0.05\mu\text{m}$.
2. Agregar volúmenes crecientes de esta solución en tubos de ensayo de 13X100 limpios, partiendo de 0.1 hasta 0.8 mL.
3. Completar el volumen de los tubos a 3 mL con agua destilada, y colocar en un tubo de ensayo 13X100 limpio, 3mL de agua destilada.
4. Agregar a cada tubo una gota de HCl concentrado y agitar.
5. Agregar 2 gotas de sulfanilamida al 0.2% y dos gotas de Clorhidrato de n-naftiletilendiamina al 0.1%, en este orden y a cada tubo.
6. Leer en el espectrofotómetro a 535nm.

ESTANDARIZACIÓN DEL INOCULO

1. Retirar suficiente masa bacilar con un aplicador de madera, de un cultivo de tres semanas de *M.tuberculosis* en L-J.
2. Colocar en un matraz Erlenmeyer de 50 mL que contenga 10 perlas de vidrio y adicionar 200 microlitros de regulador de fosfatos pH 6.8.
3. Agitar durante 5 minutos para lograr que se disgregue la masa bacilar.
4. Agregar 4 mL de regulador de fosfatos pH 6.8, continuar agitando por 10 minutos más.
5. Trasvasar con pipeta Pasteur a un tubo 13X100 mm dejar sedimentar por 15 minutos.
6. Retirar el sobrenadante Con pipeta Pasteur y colocarlo en una celda para leer en el espectrofotómetro a 580nm ajustar la absorbancia de la suspensión de manera que quede en el rango (0.256-0.302), que corresponde al tubo #1 de Mc Farland.

PRUEBA DE VIABILIDAD

- Realizar dos diluciones, 1:100 y 1:500 e inocular 0.1 mL de cada dilución en viales 12B.
- Incubar los viales a 37°C y leer diariamente en el BACTEC 460.

OBSERVACIÓN:

El índice de crecimiento Growth Index (GI) que son las unidades que maneja el BACTEC 460, indican positivo a partir de 10 en una escala que va de 0 hasta 999.

CURVA TIPO BASAL DEL METABOLISMO DE NITRATOS DE *M.tuberculosis* Vs ABSORBANCIA

1. Conservar la cepa de *M.tuberculosis* mediante la resiembra en medio Löwenstein-Jensen, para disponer de cultivo de 3 semanas.
2. Hacer una suspensión homogénea de bacilos, ajustarla al tubo # 1 de Mc Farland leer en el espectrofotómetro a 580 nm, ajustar la absorbancia de 0.256 a 0.302.
3. Colocar cantidades crecientes de esta suspensión (0.0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mL) en tubos vacíos y estériles de 13X100mm y paralelamente otra serie en L-J.
4. Agregar 1mL de nitrato de sodio a cada tubo de los anteriores.
5. Completar el volumen total a 3mL en cada tubo agregando regulador de fosfatos M/45.
6. Incubar a 37°C durante 2 horas.

7. DEMOSTRAR LA PRESENCIA DE NITRITOS

- 7.1. Agregar a cada tubo una gota de HCl concentrado y agitar, en los tubos L-J transferir el líquido sobrenadante a tubos 13X100, limpios y estériles.
- 7.2. Agregar 2 gotas de sulfanilamida al 0.2% y dos gotas de Clorhidrato de n-naftiletildiamina al 0.1%, en este orden y a cada tubo.
- 7.3. Dejar en reposo por 15 minutos para el desarrollo de color.
- 7.4. Leer en el espectrofotómetro a 535nm.

TIEMPOS DE DESARROLLO DE *M.tuberculosis* EN MEDIO L-J

1. Preparar una suspensión homogénea de bacilos y ajustar al tubo # 1 de Mc Farland ("suspensión madre"), hacer una dilución 1:100.
2. Inocular 0.1 mL de la dilución 1:100 en 20 tubos de medio L-J.
3. Incubar a 37°C, las primeras 48 horas inclinados.
4. Determinar la concentración de NO₂, en los días de incubación quinto, sexto, séptimo y octavo, en 5 tubos cada ocasión.
5. Agregar 1mL de nitrato de sodio y 1.9mL de fosfatos M/45 en cada tubo de medio L-J.
6. Incubar a 37°C por 2 horas.
7. Retirar el líquido de cada tubo de medio L-J Con pipeta Pasteur y colocarlo en un tubo 13X100.
8. Agregar a cada tubo los reactivos para el desarrollo de color, para demostrar la presencia de nitritos.
9. Leer en el espectrofotómetro a 535nm.

TIEMPOS ÓPTIMOS PARA DESARROLLO DE COLOR EN LA REACCIÓN DE NO₂.

1. Inocular 4 tubos 13X100 con 0.2 mL de suspensión de bacilos *M.tuberculosis* ajustada al tubo #1 de Mc Farland.
2. Agregar 1mL de nitrato de sodio, completar el volumen de 3 mL con fosfatos M/45.
3. Incubar 37°C por 2 horas.
4. Agregar reactivos para desarrollo de color, para demostrar la presencia de nitritos.
5. Leer en el espectrofotómetro a 535nm.
6. Realizar las lecturas de los tubos a diferentes tiempos para el desarrollo de color, a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 minutos.

CUENTA VIABLE Vs ABSORBANCIA

1. Preparar una suspensión homogénea de bacilos y ajustar al tubo # 1 de Mc Farland
2. Hacer paralelamente los siguientes ensayos de la suspensión anterior:
 - a) Realizar curva basal del metabolismo de nitratos.
 - b) Determinar la producción de NO_2 , por ***M.tuberculosis*** a distintos tiempos de incubación.
 - c) Hacer cuenta viable de la suspensión bacteriana :
 - C₁) Realizar diluciones 0.2×10^{-4} , 1×10^{-5} y 0.5×10^{-5} .
 - C₂) Inocular 0.2 mL de cada una de las diluciones en 5 tubos de medio L-J, distribuir el inóculo en toda la superficie del medio hasta la completa absorción del líquido.
 - C₃) Incubar en posición horizontal por 48 horas a 37°C.
 - C₄) Observar a las 48 horas los tubos para verificar si hay alguna contaminación, incubar en posición vertical a 37°C hasta 5 semanas.
 - C₅) Leer los cultivos a la 3^a, 4^a y 5^a, semanas, registrando el número de colonias.

DISEÑO ESTADÍSTICO

- Los resultados serán analizados por regresión lineal simple
- ANDEVA de un factor en el diseño completamente aleatorio con un $\alpha = 5\%$.
- CALCULO DE RNC: relación entre el número de colonias de 3ª y 5ª semana, este valor corresponde al cociente del número de colonias de 3ª /5ª esta proporción valora la tercera semana con respecto a la quinta, por lo tanto un valor ≥ 0.8 , se considera un lote de medio de cultivo aceptable.
- CALCULO DE I.P: es un valor que se obtiene de dividir el número bac/mL obtenido por reducción de nitratos en L-J del día 8 entre el día 5, esta razón indica cuantas veces aumento la población de bacilos.
- CALCULO DE ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD :

Sensibilidad: La proporción de sujetos con la enfermedad que tiene una prueba positiva para la enfermedad.

Especificidad: Es la proporción de sujetos sin la enfermedad que tiene una prueba negativa.

Fórmulas matemáticas empleadas

Estándar de oro				
N U E V E A	p	positivos	negativos	
	e	positivos	Verdaderos Positivos(a)	falsos positivos(b)
	b a	negativos	Falsos negativos(c)	Verdaderos Negativos(d)

$$\text{Sensibilidad: } \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Especificidad: } \frac{d}{b + d} \times 100$$

- CURVAS (COR): Es una forma de definir el punto de corte, utilizar curvas de Características Operativas para el Receptor.

RESULTADOS

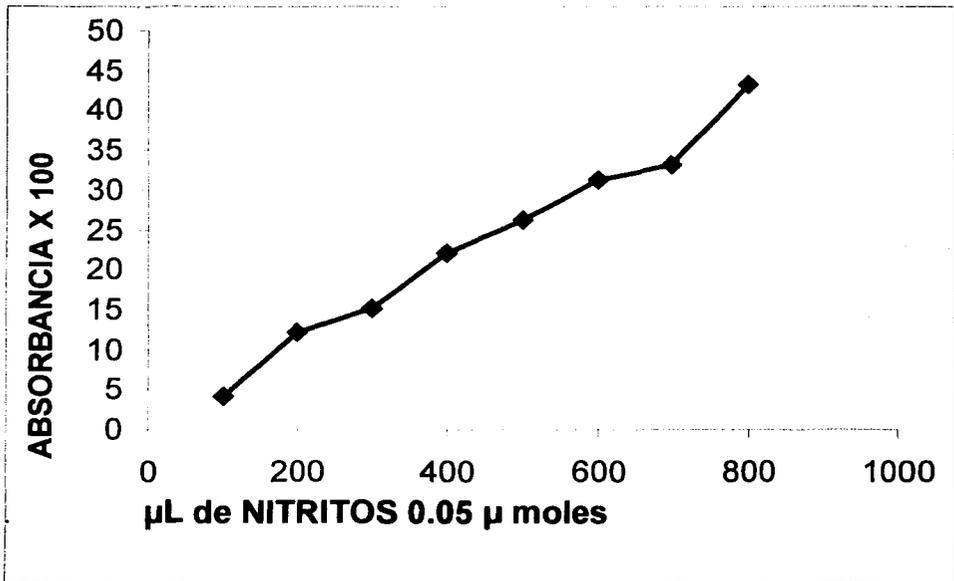
1.1.- Demostrar la proporcionalidad de concentración de nitritos Vs absorbancia.

La reacción de reducción de nitratos producida por la enzima nitrato reductasa, se pone de manifiesto por una reacción colorida en donde reaccionan los reactivos con el nitrito producido de la reducción. En la gráfica #1 se muestran los resultados de un curva patrón realizada con volúmenes crecientes de una concentración conocida de nitritos, midiendo la absorbancia de la intensidad del color producido.

GRAFICA #1

GRAFICA DE ABSORBANCIA Vs CONCENTRACIÓN CONOCIDA DE NITRITOS

CURVA PATRÓN



1.2.- Se muestran los resultados obtenidos para la realización de la curva patrón, con una concentración de nitritos conocida (0.05μ moles), incrementando los volúmenes para observar el comportamiento con respecto a la absorbancia de esta manera comprobar la ley de Lambert-Beer.

TABLA #1

ABSORBANCIA
Vs VOLUMEN DE NO_2
CURVA PATRÓN

CURVA PATRÓN	
μL de NO_2	absorbancia
100	0.038
200	0.125
300	0.153
400	0.220
500	0.264
600	0.318
700	0.325
800	0.428

1.3.-Estandarización del inóculo.

Partiendo de un antecedente en donde se maneja un inóculo de peso/volumen, de 1mg/mL ²⁵, para realizar la "suspensión madre", se realizaron los primeros ensayos con suspensiones de 1mg/mL de ***M.tuberculosis***, pero a volúmenes crecientes para simular la duplicación bacteriana, y como sustrato nitrato de sodio a una concentración constante, al obtener los primeros resultados se observó que no era conveniente y se ensayó con 2mg/mL y con 5mg/mL, en la tabla #2 se muestran los resultados de estos ensayos.

TABLA #2
ENSAYOS REALIZADOS CON PESO / VOLUMEN DE
***M.tuberculosis* POR REDUCCIÓN DE NITRATOS**

peso/volumen	mg masa bacilar de <i>M. tuberculosis</i> / mL						
Cantidades crecientes de suspensión madre.	1				2		5
	ensayo						
	1	2	3	4			
mL.	absorbancia						
0.2	0.009	0.013	0.012	0.004	0.052	0.125	
0.4	0.037	0.020	0.025	0.012	0.147	0.122	
0.8	0.041	0.028	0.034	0.054	0.461	0.127	
1.6	0.071	0.076	0.085	0.098	1.116	0.931	

1.4.-Estandarización del inoculo:

- La suspensión bacteriana de ***M.tuberculosis*** de turbidez semejante al tubo # 1 de Mc Farland, contiene aproximadamente 3×10^7 bac/mL²⁷, se realizaron repetidas lecturas de turbidez al tubo # 1 de Mc Farland para obtener un rango de absorbancia a 580nm²⁷, obteniéndose como resultado el siguiente rango de absorbancia:

(0.256 -0.302)

De esta manera la "suspensión madre" que se realizó entró dentro de este rango.

- Se ensayó con la suspensión de 2mg/mL, por ser la que contenía los valores de absorbancia más acorde con la curva patrón, pero al realizar la lectura de turbidez la absorbancia obtenida fue de:

(0.411 - 0.450)

Por resultado no entra en el rango de turbidez que corresponde al tubo # 1 de McFarland.

- Se realizó tinción de Ziehl – Neelsen:

Se observó con gran cantidad de agregados bacilares, por lo tanto no era suficientemente disgregada ni homogénea.

- Se realizó la "suspensión madre" apoyándose en el Método de las proporciones propuesto por Cannetti, Rist y Grosset⁵, siguiendo la metodología para preparar la "suspensión madre" y aprovechando el rango obtenido del tubo #1 de Mc Farland se obtuvo una suspensión con mejor grado de dispersión bacilar que permitió tener ensayos reproducibles.
- Los tubos de medio **Löwenstein-Jensen (L-J)** se inocularon con 0.1 mL de la "suspensión madre", (3×10^7 bac/mL) pero al tercer día de incubación ya se presentaba una lectura de intensidad de color muy alta: Por lo tanto no fue útil para observar la cinética de crecimiento paulatino de ***M.tuberculosis***, se optó por hacer dilución 1:100 de la "suspensión madre" e inocular 0.1mL, Obteniendo mejores resultados.

2.-Demostrar la proporcionalidad directa entre absorbancia y producción de nitritos presentes como producto de la reducción de nitratos realizada por *M.tuberculosis*.

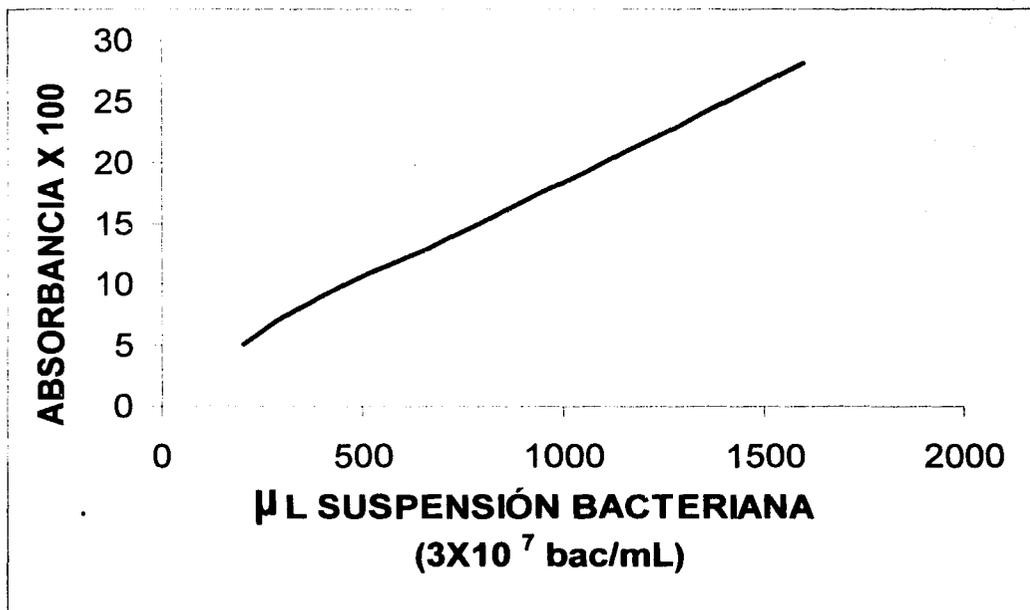
Los resultados obtenidos de la media estadística de 32 ensayos bajo las mismas condiciones se presentan en la gráfica #2, en donde se observa la proporcionalidad directa que existe entre absorbancia y cantidad de bacilos en volúmenes crecientes, partiendo de una "suspensión madre" que teóricamente equivale a 3×10^7 bac/mL²⁷.

Cumpliendo de esta manera con la ley de Lambert-Beer, la cual nos dice:

"La absorbancia aumenta linealmente con la concentración.

GRAFICA #2

GRÁFICA ABSORBANCIA Vs CONCENTRACIÓN
BACTERIANA
CURVA BASAL

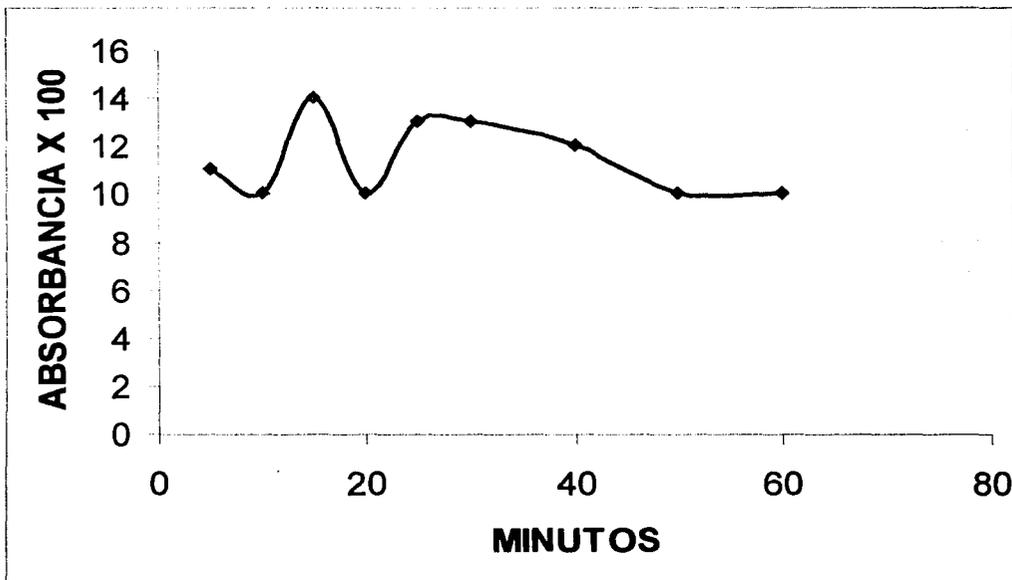


3.-Determinar el tiempo óptimo de desarrollo de color en la reacción de nitritos.

Se evaluó el tiempo transcurrido a partir de añadir los reactivos para el desarrollo de color en un rango de 5 -60 minutos., por medio de la absorbancia, en la gráfica #3 se presentan los resultados obtenidos de 6 ensayos bajo las mismas condiciones.

GRAFICA #3

GRÁFICA DE TIEMPOS ÓPTIMOS PARA EL DESARROLLO DE COLOR EN LA REACCIÓN NO_2



4.-Demostrar la viabilidad de *M.tuberculosis*, en los inóculos por BACTEC 460.

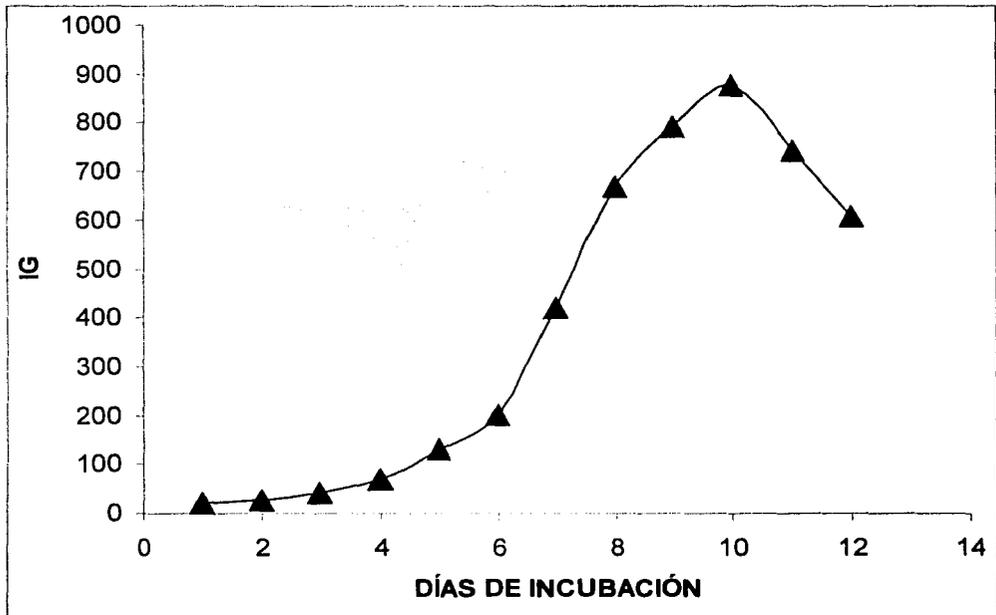
En el BACTEC 460, que es el método radiométrico se evidencio la viabilidad de los bacilos presentes en el inóculo por medio del incremento del índice de crecimiento (IG).

GRAFICA #4

DEMOSTRACIÓN DE LA VIABILIDAD DE *M.tuberculosis* POR MÉTODO RADIOMETRICO

GRAFICA DE DÍAS Vs INDICE DE CRECIMIENTO (IG)

(BACTEC 460)



5.-Establecer los tiempo óptimos para manifestar el incremento de la población de *M.tuberculosis*, por medio de la reducción de nitratos.

Se demostró la posibilidad de valorar los cambios de población por la cantidad de nitritos obtenidos y en razón del tiempo de generación de *M.tuberculosis* que es de 18 a 24 horas, se inicio apartir del primer día hasta el día 8 de incubación, se inóculo 0.1mL de una dilución 1:100 de la "suspensión madre", incubando a 37°C, en la gráfica # 5 se presentan los resultados obtenidos de la media estadística de 4 ensayos bajo las mismas condiciones.

GRAFICA #5

TIEMPOS DE DESARROLLO DE *M.tuberculosis* EN MEDIO L-J
GRAFICA DE DÍAS Vs ABSORBANCIA



6.-Demostrar por reducción de nitratos la cinética de crecimiento de *M.tuberculosis* en Löwenstein-Jensen.

6.1.1.-Cuenta viable:

Los resultados obtenidos por cuenta viable, técnica utilizada actualmente para medir el control de calidad de medios de cultivo conocida también como: "promoción del desarrollo", lo cual nos manifiesta la idoneidad del medio de cultivo para proporcionar los elementos requeridos para la duplicación de los bacilos, en la tablas #3 se presentan los resultados obtenidos de la media estadística de 5 repeticiones bajo las mismas condiciones realizando 4 ensayos en cuenta viable.

Se representan tres diferentes diluciones en el cuadro #1 de acuerdo a la estimación teórica que le corresponde partiendo de una "suspensión madre" que equivale a 3×10^7 :

Cuadro # 1

Estimación teórica del inóculo empleado

Dilución	bac/mL	Inóculo bac/0.2mL
0.2×10^{-4}	600	120
1×10^{-5}	300	60
0.5×10^{-5}	150	30

Se realizó el conteo de colonias apartir de la tercera semana hasta la quinta semana, realizando análisis de varianza de un factor.

TABLAS #3

CUENTA VIABLE DE *M.tuberculosis*, 3^a, 4^a y 5^a SEMANA

600 bac/mL		
UFC/mL X 10 ⁵		
3 ^a semana	4 ^a semana	5 ^a semana
7.5	7	7
31.7	37.1	30.9
3.3	6.3	4.9
4.1	10.7	18.3

$F_{CAL} = 0.0951$

300 bac/mL		
UFC/mL X 10 ⁵		
3 ^a semana	4 ^a semana	5 ^a semana
11.2	18.4	17.2
57.6	67.8	64.85
4.8	9.2	242
11	27	40

$F_{CAL} = 1.104$

150 bac/mL		
UFC/mL X 10 ⁵		
3 ^a semana	4 ^a semana	5 ^a semana
11.6	8.8	18
85.2	253.6	156
4.8	5.2	8
4.6	5.6	14.8

$F_{CAL} = 0.1653$

$N=12$

$\alpha=5\%$

$1 - \alpha = 0.95$

$F_{TEO, 2, 9, 0.95} = 4.26$

ANALISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

H_0 = No hay diferencia significativa en el incremento de UFC entre la 3^a, 4^a, 5^a semana.

H_a =Si existe diferencia significativa en el incremento de UFC entre la 3^a, 4^a, 5^a semana.

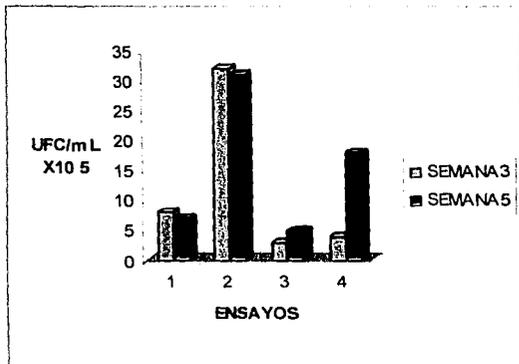
CONCLUSIÓN ESTADÍSTICA: Se acepta H_0 con una $\alpha=5\%$, por lo tanto no existe diferencia significativa en el incremento de UFC entre la 3^a semana, 4^a semana, 5^a semana.

6.1.2.- Cuenta viable:

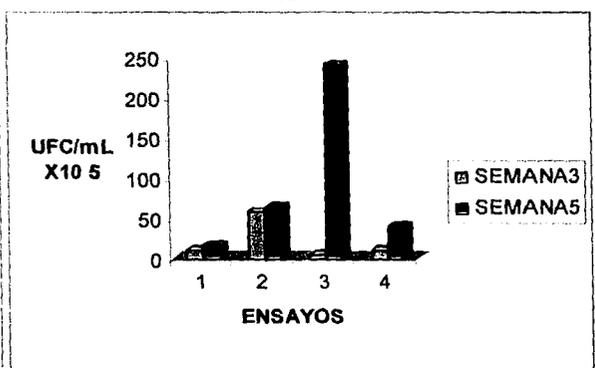
Los resultados obtenidos de la media estadística de 5 repeticiones bajo las mismas condiciones realizando 4 ensayos, comparando cuenta viable de *M.tuberculosis*, de la tercera semana contra quinta semana en las tres diferentes concentraciones de bacterias, 600,300 y 150 bac/mL.

GRAFICAS #6
INCREMENTO EN CUENTA VIABLE
DE TERCERA A QUINTA SEMANA

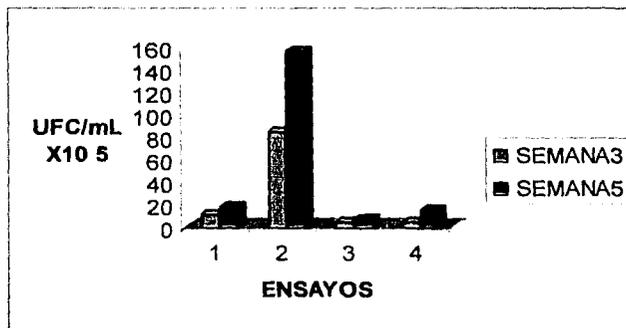
600 bac/mL



300 bac/mL



150 bac/mL



6.2.1.-Cinética de crecimiento de *M.tuberculosis* demostrada por reducción de nitratos en Löwenstein-Jensen (L-J).

Se describen los resultados obtenidos por medición indirecta mediante la reacción de nitratos durante los días de incubación, 5, 6,7 y 8.

Es medición indirecta porque se valoró el incremento de la población de bacilos por la cantidad de nitritos generada por la actividad nitrato reductasa de la bacteria en los tubos de L-J, inoculados con 0.1mL de una dilución 1:100, de la "suspensión madre" e incubando a 37°C, a partir del día 5 de incubación, se realizó en el tubo de L-J la reacción de reducción de nitratos, al medir la intensidad de color por absorbancia a 535nm²⁵, este valor se interpolo en su correspondiente curva basal, para cambiar este valor a μL de "suspensión madre", que equivale a 3×10^7 bac/mL, estimando así bac/mL en cada absorbancia obtenida que se muestra en la tabla #4.

A los resultados obtenidos en la tabla # 4 se les realizó análisis de varianza de un factor, para poder comprobar estadísticamente si existe diferencia en el incremento poblacional del día 5 al día 8.

Cinética de crecimiento de *M.tuberculosis* demostrada por reducción de nitratos en Löwenstein-Jensen (L-J).

TABLA #4

CRECIMIENTO DE *M.tuberculosis* EN MEDIO L-J MEDIDO POR LA REDUCCIÓN DE NITRATOS DEL DÍA 5 AL DÍA 8

Número ensayo	Día 5 (bac/mL)X10 ⁶	Día 6 (bac/mL) X10 ⁶	Día 7 (bac/mL) X10 ⁶	Día 8 (bac/mL) X10 ⁶
1	54.236	66.104	85.79	180.12
2	53.547	38.622	126.99	177.128
3	49.302	39.382	70.5	141.33
4	52.54	45.77	78.624	136.855

ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

N=16 **α**=5% **1- α**= 0.95

F_{CAL}= 3.8504 **F_{TEO, 3, 13,0.95}**= 3.41

Ho= No hay diferencia significativa en el incremento de bacterias del día 5 al día 8.

Ha=Si existe diferencia significativa en el incremento de bacterias del día 5 al día 8

CONCLUSIÓN ESTADÍSTICA: Se rechaza Ho con una α=5%, por lo tanto si existe diferencia significativa en el incremento de bacterias del día 5 al día 8

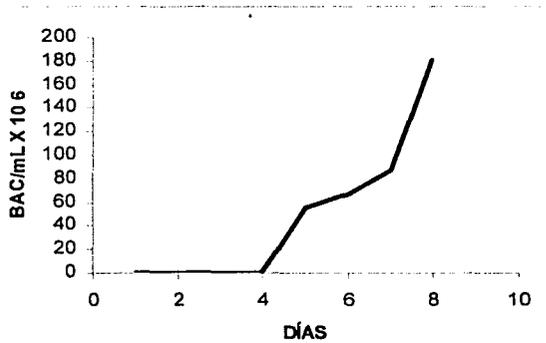
6.2.2.-Representación gráfica de la Cinética de crecimiento de *M.tuberculosis* demostrada por reducción de nitratos en Löwenstein-Jensen (L-J).

La reacción enzimática de reducción de nitratos en medio L-J, proporciona de manera indirecta el incremento poblacional de *M.tuberculosis*, en la gráfica #7 se muestra el comportamiento de un rango de cuatro días, partiendo del día 5 al 8, en 4 ensayos los cuales cada uno son la media estadística de 5 pruebas bajo las mismas condiciones.

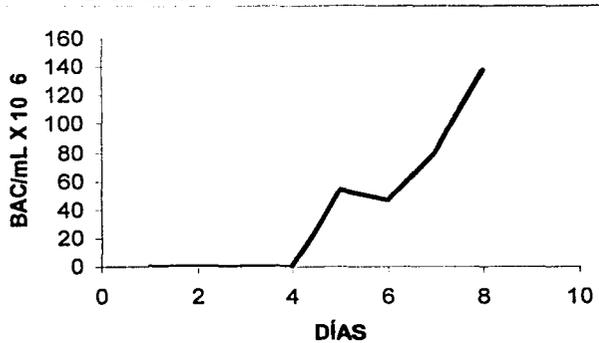
GRAFICAS # 7

INCREMENTO EN LA REDUCCIÓN DE NITRATOS POR
CULTIVOS DE *M.tuberculosis* EN L-J COMPARANDO
DESDE EL DÍA 5 HASTA EL DÍA 8.

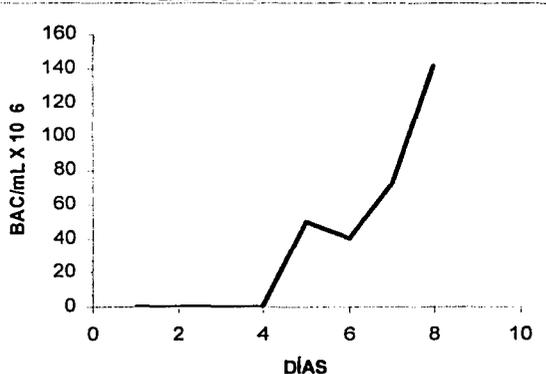
ENSAYO # 1



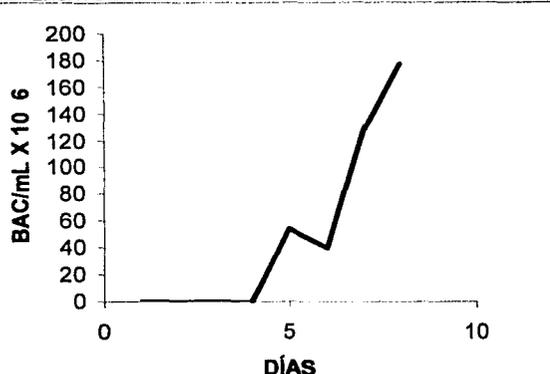
ENSAYO # 2



ENSAYO # 3



ENSAYO # 4



6.3.1.- Reducción de nitratos en L-J:

Se describen los resultados obtenidos, por reducción de nitratos en los días de incubación 5 y 8 de 20 ensayos bajo las mismas condiciones en la tabla #5, se comparan los incrementos de población (bac/mL) entre los días 5 y 8 correspondientes a la interpolación de los valores de absorbancia de nitritos, en la curva basal.

TABLA #5
INCREMENTO DE LA POBLACIÓN DE *M.tuberculosis*
MEDIDO POR REDUCCIÓN DE NITRATOS EN MEDIO L-J, DEL
DÍA 5 Y DÍA 8

ENSAYO	Día 5 (bac/mL) $\times 10^8$	Día 8 (bac/mL) $\times 10^8$
1	13.33	87.75
2	77.85	446.25
3	15.75	20.4
4	140.4	233.1
5	23.85	113.1
6	18.08	23.49
7	86.26	398.85
8	12.136	18.3
9	130.87	392.2
10	20.4	52.8
11	16.23	29.7
12	76.83	359.55
13	25.8	24.45
14	108.9	207
15	18.75	85.95
16	15.70	80.145
17	81	429.88
18	16	15.75
19	112.26	29.1
20	37.54	129.4

ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR

$N=40$

$\alpha=5\%$

$1-\alpha=0.95$

$F_{CAL}=6.68$

$F_{TEO, 1, 40, 0.95}=4.08$

H_0 = No hay diferencia significativa en el incremento de bacterias entre día 5 y el día 8.

H_a =Si existe diferencia significativa en el incremento de bacterias entre el día 5 el día 8.

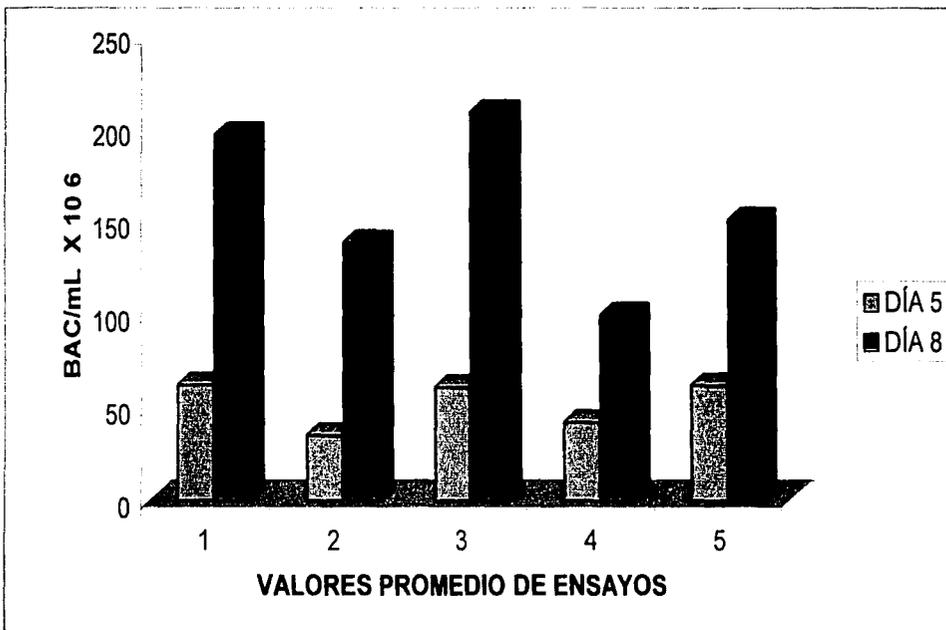
CONCLUSIÓN ESTADÍSTICA: Se rechaza H_0 con una $\alpha=5\%$, por lo tanto si existe diferencia significativa en el incremento de bacterias entre el día 5 y el día 8.

6.3.2.- Reducción de nitratos en L-J.

Los resultados obtenidos por reducción de nitratos en medio L-J, en los días de incubación 5 y 8 que se presentan en la gráfica #8, son 20 repeticiones bajo las mismas condiciones, agrupados en 5 bloques (valores promedio de ensayos) que representan la media estadística de 4 ensayos, de los cuales se obtuvo la absorbancia y se interpoló en su curva basal correspondiente para obtener las unidades de bac/mL.

GRAFICA #8

COMPARACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE NITRATOS DE LOS CULTIVOS DE *M.tuberculosis* EN L-J A LOS DÍAS 5 Y 8.



7.1.-Cuenta viable Vs reducción de nitratos en medio L-J.

Se presentan los resultados obtenidos en 20 ensayos bajo las mismas condiciones, realizado paralelamente cuenta viable y reducción de nitratos en L-J, a partir de la misma "suspensión madre".

Se muestran en la tabla #6 los resultados resumidos de cuenta viable expresados relación entre el número de colonias de 3ª y 5ª semana (**RNC**), este valor corresponde al cociente del número de colonias de 3ª /5ª esta proporción valora la tercera semana con respecto a la quinta, por lo tanto un valor ≥ 0.8 , se considera un lote de medio de cultivo aceptable.

Los resultados de reducción de nitratos en L-J expresados en incremento poblacional (**I.P**), es un valor que se obtiene de dividir el número bac/mL obtenido por reducción de nitratos en L-J del día 8 entre el día 5, esta razón me indica cuantas veces aumento la población de bacilos.

TABLA #6

COMPARACIÓN DE CUENTA VIABLE (I.C) Y REDUCCIÓN DE

NITRATOS EN
L-J (I.P)

ENSAYO	8/5 DÍAS	I.P	3/5 SEMANA	RNC
1	87.75/13.33	6.58	4/4	1
2	446.25/77.85	5.73	2/2	1
3	429.88/81	5.3	10/9	1.1
4	80.145/15.70	5.1	1/1	1
5	113.1/23.85	4.7	2/2	1
6	359.55/76.83	4.6	5/5	1
7	398.85/86.26	4.6	5/5	1
8	85.95/18.75	4.58	1/1	1
9	129.4/37.54	3.44	3/3	1
10	392.2/130.87	2.99	1/1	1
11	52.8/20.4	2.58	0/40	0
12	207/108.9	1.9	0/16	0
13	29.7/16.23	1.8	3/3	1
14	233.1/140.4	1.6	2/11	0.18
15	18.3/12.136	1.5	0/0	0
16	20.4/15.75	1.29	3/4	0.75
17	23.49/18.08	1.2	0/10	0
18	15.75/16	0.98	0/0	0
19	24.45/25.8	0.94	0/10	0
20	29.1/112.26	0.258	1/5	0.2

7.2.- Comparación de la técnica de cuenta viable contra la técnica de reducción de nitratos en L-J.

Para obtener la sensibilidad y especificidad de la técnica a probar se muestra en el cuadro #2 las fórmulas empleadas, que en este caso es reducción de nitratos en L-J, los resultados obtenidos de 20 ensayos bajo las mismas condiciones se agruparon en rangos de (I.P), se describen en la tabla #7.

TABLA #7
SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA REDUCCIÓN DE NITRATOS PARA VALORAR EL DESARROLLO DE *M.tuberculosis* EN LOS CULTIVOS DE L-J.

RANGO DE I.P	SENSIBILIDAD %	ESPECIFICIDAD %
1.1 - 7	100	33
2.1 - 7	90	88
3.1 - 7	82	100
4.1 - 7	72	100
5.1 - 7	36	100
6.1 - 7	9	100

Cuadro # 2

Fórmulas matemáticas empleadas

Estándar de oro			
N U E V A	p r o p o s i t i v o s	positivos	negativos
		positivos	Verdaderos Positivos(a)
	b a	n e g a t i v o s	Falsos negativos(c)

Sensibilidad: $\frac{a}{a + c} \times 100$

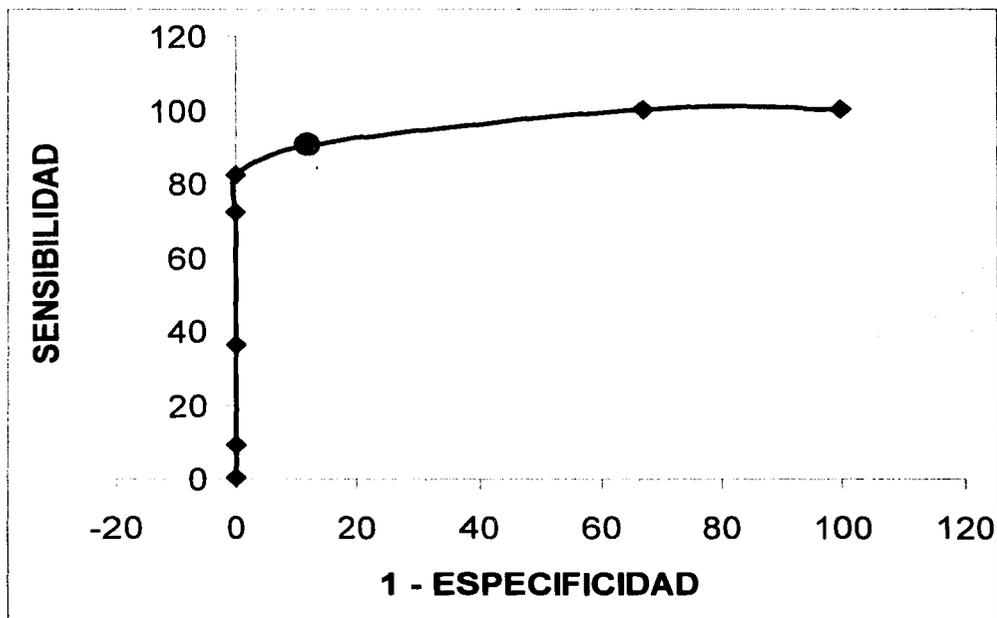
Especificidad: $\frac{d}{b + d} \times 100$

7.3.- Obtención del valor de corte de la técnica de reducción de nitratos.

Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos se utilizaron para construir una curva de características operativas para el receptor (COR), el "estándar de oro" se consideró el valor de $RNC \leq 0.8$ obtenido en cuenta viable, para obtener el valor de corte de la técnica de reducción de nitratos, el mejor punto de corte es aquel que se ubica en el ángulo superior izquierdo en donde la especificidad y la sensibilidad sean altas.

GRAFICA #9

CURVA DE CARACTERÍSTICAS OPERATIVAS PARA EL RECEPTOR (COR), EN LA COMPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE ORO QUE ES DE CUENTA VIABLE Vs TÉCNICA DE REDUCCIÓN DE NITRATOS EN MEDIO L-J.



● PUNTO DE CORTE (sensibilidad: 90%, especificidad: 88%)

DISCUSIÓN

La realización de este trabajo se fundamenta en la ley de Lambert-Beer y en la reacción enzimática de la nitrato reductasa que reduce el nitrato a nitrito, en donde el nitrito se puede detectar mediante una reacción colorida y medir en espectrofotómetro la intensidad del color, el cuál basándonos en la ley de Lambert-Beer que nos indica que la "absorbancia aumenta linealmente con la concentración", asumimos de manera indirecta la información de la cantidad de bacterias presentes por su manifiesto metabólico por lo tanto, conociendo las características de *M.tuberculosis* la cuál tiene la capacidad de reducir nitratos, indirectamente nos proporciona información acerca de la viabilidad y cinética de crecimiento de *M.tuberculosis*, de esta manera podemos estimar la eficiencia del medio por la recuperación de bacterias.

1.-Los primeros resultados obtenidos, son de una gráfica en donde se utiliza una concentración conocida de nitritos (0.05 M moles), en volúmenes crecientes para poder probar la proporcionalidad directa entre la absorbancia y la intensidad de color de los nitritos, esto se demuestra en la gráfica #1 y en la tabla #1, en donde se observa esta proporcionalidad que existe, comprobando de esta manera la ley de Lambert-Beer, estos resultados también se utilizaron para los primeros intentos de estandarización del inóculo.

Se muestran en la tabla #2 los resultados probando esta concentración de peso / volumen de 1mg/mL, presentaron desventajas importantes de no contar con peso seco, por que se parte de una cepa joven de tercera semana, la otra desventaja es la dificultad para homogeneizar esta suspensión, en consecuencia los valores de absorbancia obtenidos eran muy bajos del orden de (0.0013 -0.08), en tanto que la absorbancia en la curva patrón oscila entre (0.038-0.428), y en los resultados era evidente la mala homogeneidad de la suspensión, para obtener lecturas mayores se

trabajó con 2mg/mL y 5mg/mL ,en donde al obtener valores más cercanos a la absorbancia de la curva patrón en la suspensión de 2mg /mL.

Para disponer de una comparación objetiva de la turbidez en la suspensión, fue satisfactorio evaluar la turbidez del tubo #1 de Mc Farland en el espectrofotómetro a 535nm obteniendo un rango, que proporcionó la confianza de repetir la suspensión lo más semejante posible en cada ensayo.

Al medir la turbidez de la suspensión de 2mg/mL esta se encontró fuera del rango, y con mala dispersión observando esto con la tinción de Ziehl – Neelsen: gran cantidad de agregados bacilares, por lo tanto se suprimió.

Se realizó la “suspensión madre” basándose en el Método de las proporciones propuesto por Cannetti, Rist y Grosset⁵, siguiendo la metodología para preparar la “suspensión madre” y aprovechando el rango obtenido del tubo #1 de Mc Farland se obtuvo una suspensión con mejor grado de dispersión bacilar que permitió tener ensayos reproducibles, logrando de esta manera mayor dispersión bacilar y reproducibilidad en la realización de la “suspensión madre”, esto fue muy fundamental por que todos los ensayos dependen de la “suspensión madre” debido a que es el punto de partida.

El tubo #1 de Mc Farland teóricamente corresponde a 3×10^8 bac /mL¹⁷, para las micobacterias se estima que el tubo #1 de Mc Farland corresponde a 3×10^7 bac /mL²⁷, por la gran cantidad de lípidos que contienen.

Los tubos de medio **Löwenstein-Jensen (L-J)** se inocularon con 0.1 mL de la “suspensión madre”, pero el inóculo era muy grande lo cual imposibilitó observar la progresión paulatina de reducción de nitratos en el cultivo en L-J, por que desarrolla color intenso desde el tercer día.

Se optó como adecuado hacer dilución 1:100 de la "suspensión madre" e inocular 0.1mL. Obteniendo mejor resultado por que hubo un incremento en el paso de los días.

2.-La duplicación de los bacilos esperada en el medio L-J se representó con la realización de la "curva basal" que es el ensayo de cantidades crecientes de la "suspensión madre" a fin de simular el desarrollo de la población bacilar en aproximadamente 4 generaciones (1 generación es de 18-24 horas).

Efectivamente se observa un desarrollo de color proporcional a la cantidad de bacilos utilizados; pero esta progresión de la población correspondería a la fase de crecimiento logarítmico en la que se observa el efecto enzimático de una mayor población de **M.tuberculosis** y naturalmente es la fase que nos daría mayor información de la aptitud del medio de cultivo para la duplicación de los bacilos, se muestran estos resultados en la gráfica #2 en donde se prueba que cumple con la proporcionalidad directa, por que la absorbancia aumenta linealmente a la concentración en la prueba del desarrollo de **M.tuberculosis** en el medio de L-J.

3.-No existe información en la bibliografía que se refiera al tiempo de lectura de la reacción de desarrollo de color; además se observó que el color es inestable con el paso del tiempo esto encaminó a determinar el tiempo óptimo, realizando ensayos después de adicionados los reactivos, para el desarrollo de color encontrando que a los 15 minutos los resultados eran reproducibles.

4.- Es preciso recordar que la "suspensión madre" se evaluó por turbidez misma que puede ser debida además de la concentración de los bacilos por partículas del medio de cultivo; se demostró la viabilidad del inóculo de **M.tuberculosis**, por método radiométrico, en el BACTEC 460, evidenciando la viabilidad del inóculo por incremento de índice de

crecimiento (I.G) el aumento de CO₂ producido por la población bacteriana.

5.- La demostración del crecimiento bacteriano de **M.tuberculosis** como manifestación de la aptitud del medio de cultivo L-J fue valorada por el desarrollo de color de los nitritos producidos por una población creciente de bacilos a partir de un inóculo de 0.1 mL de la dilución 1: 100 de la "suspensión madre", se hicieron lecturas de absorbancia en los días de incubación 1 hasta el 8, se observó que la fase de adaptación se ubica en los días 1 al 5, donde la población se mantiene bastante baja.

A partir del quinto día si se observa la fase de crecimiento logarítmico que es la que nos demuestra el incremento franco de población siendo este intervalo el seleccionado para las próximas valoraciones.

6.-El control de calidad que se refiere en documentos oficiales como la "nota técnica # 27" de la OPS/OMS⁴⁰, esta basada en cuenta viable que para **M.tuberculosis**, tiene los inconvenientes de la dificultad de obtener suspensiones homogéneas y estables y los tiempos amplios de incubación de ahí que la metodología de drogasensibilidad que se basa en cuenta viable requiere de personal con un alto grado de entrenamiento que solamente se adquiere y mantiene con la practica constante de la ejecución de la técnica.

Se realizó cada semana cuenta viable de **M.tuberculosis**, de los valores obtenidos se efectuó el análisis estadístico, como resultado no hay diferencia significativa entre la 3^a, 4^a y 5^a semana, esto quiere decir que se obtuvo un número de colonias que corresponde cuando menos al 80% de las encontradas en la 5^a semana, este valor demuestra la capacidad del medio que permite a los bacilos tener tiempos de adaptación más cortos.

Establecidas ya las condiciones idóneas, para realizar la cinética de crecimiento de *M.tuberculosis* por reducción de nitratos, se realizaron 20 ensayos de los que se resumen, en la tabla #4 y gráfica #7, observándose una diferencia importante de población entre las lecturas de los días 5 y 8 como ya había sido demostrada en la curva tiempos de desarrollo de *M.tuberculosis* en medio L-J (gráfica de días Vs absorbancia), de tal manera que estos dos puntos son útiles para demostrar el incremento de población de bacilos que acredita el uso de la reducción de nitratos con el fin de valorar la capacidad del medio L-J para favorecer la duplicación bacteriana, hasta el día octavo con un ahorro significativo de tiempo ya que la cuenta viable requiere de 5 semanas.

Se realizó análisis estadístico por medio de análisis de varianza de un factor, obteniendo como conclusión estadística que existe diferencia significativa del día 5 al día 8 lo que comprueba que si existe un incremento poblacional.

Comparando el incremento poblacional del día 5 y el día 8, es más evidente la duplicación, esto se comprueba por que incremento el número de bacilos capaces de producir nitritos del día 5 al día 8, lo que indirectamente pone de manifiesto la habilidad del medio para proporcionar los elementos necesarios para la duplicación de la bacteria, en la tabla #5 se muestra claramente estas diferencias, comprobada también por el análisis estadístico, análisis de varianza de un factor, obteniendo como conclusión estadística que existe diferencia significativa entre el día 5 y el día 8, así la evaluación del medio de cultivo en tiempos más cortos nos proporciona la ventaja de conocer la calidad del medio antes que concluya el periodo de caducidad.

La validación de una nueva prueba requiere demostrar la eficiencia cotejándose con el estándar de oro, en la tabla #6 se cotejan incremento de población contra relación entre el número de colonias de 3^a y 5^a semana (RNC).

En este trabajo el estándar de oro es cuenta viable con los valores de $RNC \geq 0.8$ considerando el valor de 0.8 como índice de aceptación, en tanto que los valores I.P son las cifras de reducción de nitratos que indirectamente indican las veces que se incremento la población.

Demostrando de igual manera por dos técnicas que los medios de cultivo son útiles para el desarrollo de los bacilos y por lo tanto el incremento de la población.

Las dos técnicas cuenta viable y reducción de nitratos son útiles para valorar la calidad del medio de cultivo por el incremento de la población de bacilos.

Para realizar esta comparación se dispuso de los resultados de 20 ensayos, realizados paralelamente, cuenta viable y reducción de nitratos, con los valores I.P obtenidos se agrupan en seis rangos mismos que correspondían a ≥ 0.8 de RNC que es en cuenta viable el que corresponde al valor de aceptación; de esta manera se determinó la especificidad y sensibilidad de la técnica de reducción de nitratos y en base a estos valores se construyó la curva de Características operativas para el Receptor (COR), en donde el punto de corte de I.P por reducción de nitratos corresponde a ≥ 2.1 (sensibilidad 90%, especificidad 88%).

Obteniendo el valor de corte para I.P en reducción de nitratos, esta disponible el ensayo enzimático de reducción de nitratos para valorar el desarrollo de ***M.tuberculosis*** en medio L-J.

CONCLUSIONES

- El tamaño óptimo del inóculo obtenido permitió evaluar la cinética de crecimiento de ***M.tuberculosis***, observándose los cambios de población bacilar paulatinamente.
- La concentración de nitritos producto de la actividad enzimática de ***M.tuberculosis***, es directamente proporcional a la absorbancia.
- En la reacción de desarrollo de color se observó una estabilidad a los 15 minutos de agregados los reactivos para el desarrollo de color.
- La evaluación de viabilidad de los bacilos por BACTEC 460 es útil para estandarización del inóculo de ***M.tuberculosis***.
- La manifestación franca del incremento de la población de ***M.tuberculosis***, se obtuvo al octavo día de incubación.
- Se demostró la cinética de crecimiento de ***M.tuberculosis*** en L-J seguida por reducción de nitratos, observándose que reduce significativamente el tiempo de obtención de resultados con respecto al tiempo en cuenta viable, de tres semanas a una semana con la técnica de reducción de nitratos.
- La técnica de reducción de nitratos en medio L-J es una técnica que presenta una sensibilidad de 90% y una especificidad 88%, apropiada, con respecto al estándar de oro que es la cuenta viable y un valor de corte de $I.P \geq 2.1$.

RECOMENDACIÓN

Realizar un mayor número de ensayos para validar con un amplio respaldo estadístico una prueba que permite tener resultados oportunos.

Utilizar esta prueba para conocer la calidad del medio antes que concluya el período de caducidad.

Relacionar la reducción de nitratos con el porcentaje de aislamiento de ***M.tuberculosis***, en muestras clínicas.

ANEXO 1:

MÉTODO DE LAS PROPORCIONES PROPUESTO POR CANNETTI, RIST Y GROSSET⁵

PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN

1. Tomar con el asa metálica el mayor número posible de las colonias desarrolladas en el tubo de cultivo de la cepa en estudio y colocarlas en el matraz con perlas de vidrio, al que previamente se han adicionado 5 gotas de agua destilada estéril.
2. Agitar el frasco manualmente durante uno a dos minutos y agregar aproximadamente 4 mL de agua destilada estéril.
3. Agitar el tubo para homogeneizar y dejar sedimentar de 30 a 60 segundos.
4. con una pipeta Pasteur retirar la parte homogénea y colocarla en el tubo destinado a preparar la suspensión conforme al patrón, para lo cual se va agregando agua destilada y agitando, hasta que su opacidad se ajuste a la del patrón Mac Farland #1 esta es la llamada "suspensión madre".
5. A partir de la suspensión madre se prepara seis nuevas suspensiones en escala decimal, utilizando los seis tubos con 9 mL de agua destilada estéril rotulados de 10^{-1} a 10^{-6} y las siete pipetas de 1 mL graduada en centésimas.

6. Las suspensiones decimales se hacen tomando 1ml de la suspensión madre y mezclándolo con los 9 mL de agua destilada del primer tubo es decir el rotulado 10^{-1} .

7. Agitar hasta obtener una suspensión homogénea y con una nueva pipeta estéril, tomar 1 mL de la suspensión 10^{-1} y añadirlo a los 9 mL de agua destilada del tubo 10^{-2} , en la misma forma de antes. Se continúa así sucesivamente hasta preparar las seis diluciones.

8. Hay que insistir que para la fidelidad de la prueba es fundamental que se use una pipeta para cada dilución, que los 9 mL de agua destilada sean medidos exactamente y que se transfieran exactamente 1 mL de suspensión de un tubo a otro.

9. No es aconsejable utilizar procedimientos diferentes a los indicados, por que si bien puede significar economía de tiempo o de material, disminuye considerablemente la exactitud de las suspensiones decimales.

ANEXO 2:

REDUCCIÓN DE NITRATOS MÉTODO SHOWE Y DEMOSS⁵

1. Colocar de 3 a 4 gotas de agua destilada en tubos 16X125mm con tapa de rosca.
2. Introducir un asa bien cargada de bacilos en cada tubo y homogeneizar bien.
3. Agregar 1 mL del sustrato. Agitar e incubar a 37°C durante 2 horas.
4. Agregar 1 gota de HCl concentrado y agitar con la mano.
5. Adicionar dos gotas de sulfanilamida al 0.2%.
6. Añadir dos gotas de clorhidrato de n-naftilendiamina al 0.1%

ANEXO 3:

CURVAS DE CARACTERÍSTICAS OPERATIVAS PARA EL RECEPTOR (COR)^{28, 29.}

En general hay concesiones entre la sensibilidad y la especificidad de una prueba diagnóstica. Obviamente, es deseable tener una prueba que sea a la vez muy sensible y muy específica. Lamentablemente, con frecuencia esto es imposible.

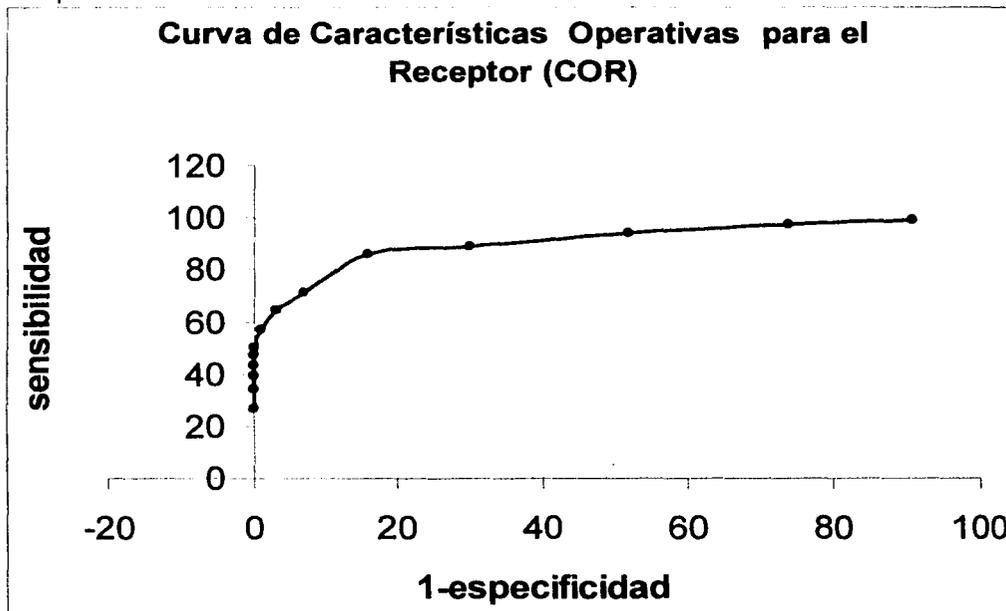
Se requiere establecer compromisos entre la sensibilidad y la especificidad cuando los datos clínicos se esparcen en un intervalo de valores. En esas situaciones, la localización de un "punto de corte", un punto en un continuo entre lo normal y lo anormal, es una decisión arbitraria.

Como consecuencia para cualquier resultado de una prueba dada, expresada en una escala de intervalo, una característica (p. Ej. La sensibilidad) sólo puede ser aumentada a expensas de otra (especificidad).

Otra forma de definir el punto de corte es utilizar curvas de características operativas para el receptor (COR). Originalmente usadas en electrónica, las curvas COR son una forma de representar gráficamente los compromisos inherentes a la mejora de la especificidad y la sensibilidad de una prueba, el investigador selecciona varios puntos de corte y determina la sensibilidad y la especificidad en cada uno de ellos.

Una prueba ideal se sitúa en el ángulo superior izquierdo de la gráfica (sensibilidad y especificidad del 100%). Una prueba sin ningún valor sigue la diagonal que va del ángulo inferior izquierdo al superior derecho: cada incremento de la sensibilidad se asocia a una pérdida de igual magnitud de especificidad.

A continuación se representa gráficamente la sensibilidad en función de la expresión $[1 - \text{especificidad}]$. A esta última a veces se le denomina tasa de falsos positivos.



La mayoría de las curvas COR presentan un segmento de gran pendiente, en el cual la sensibilidad aumenta mucho mientras que la tasa de falsos positivos prácticamente no varía.

No tiene mucho sentido elegir el punto de corte en esta zona, puesto que el desplazamiento hacia arriba por la curva aumentará la sensibilidad sin reducirse sustancialmente la especificidad. De forma similar tampoco es aconsejable seleccionar el punto de corte en la zona plana de la curva, ya que la sensibilidad se mantiene prácticamente inalterada mientras que la tasa de falsos positivos aumenta. Por lo general el mejor punto de corte se sitúa en la zona donde la curva COR "tuerce la esquina". Una ventaja muy importante de las curvas COR es que puede compararse las correspondientes a distintas pruebas diagnósticas: cuanto mejor sea la curva más se acercará su curva al ángulo superior izquierdo.

GLOSARIO Y ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection.

BCG: bacilo de una cepa virulenta de *M.tuberculosis* var.bovis atenuada por cultivos repetidos en un medio que contiene bilis.

Calidad: Realizar el procedimiento correcto, hacerlo bien y satisfacer al cliente.

Crecimiento: Proliferación de células en un cultivo bacteriano.

Control de calidad: Son las técnicas operativas y actividades necesarias para cumplir con los requisitos de calidad y concierne el monitoreo, diario de los procedimientos realizados en le laboratorio.

Cultivo: Propagación de microorganismos u otras células vivas en medios que permiten y favorecen su desarrollo.

Endémico: Relativo a ciertas; región o tipo de personas; se aplica a una enfermedad que se, presenta más o menos constantemente en cualquier localidad.

Epidemia: Brote extenso, o período de frecuencia excepcionalmente alta de una enfermedad, en una comunidad o área.

Garantía de calidad: Debe existir un programa planteado y sistemático de monitoreo y evaluación de los servicios de laboratorio para resolver problemas que se presenten y son identificados.

I.P: es un valor que se obtiene de dividir el número bac/mL obtenido por reducción de nitratos en L-J del día 8 entre el día 5, esta razón me indica cuantas veces aumento la población de bacilos.

L-J: Löwenstein-Jensen.

Morbilidad: Relación entre el número de individuos enfermos y la población total de una comunidad.

Pandemia: epidemia muy extendida o que afecta a la mayoría de los habitantes de una región.

RNC: es un valor que corresponde al cociente del número de colonias de 3^a /5^a esta proporción valora la tercera semana con respecto a la quinta, por lo tanto un valor ≥ 0.8 , se considera un lote de medio de cultivo aceptable.

Suspensión madre: suspensión ajustada al tubo #1 de Mac Farland.

Viable: Microorganismo que tiene la capacidad de crecer y multiplicarse.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García del Valle Araceli, Zamudio Durán Ma de las Mercedes, Manual de Microbiología Médica, UNAM, F.E.S. ZARAGOZA, Carrera Q.F.B., 9° semestre, 1998, pp. (125-130).
2. Farga Victorino; Tuberculosis; 2ªed.; Ed. Mediterráneo; Santiago de Chile, 1992, pp. (17, 107-108, 253-254).
3. Carrillo Aguado J. L., Quién le pone el cascabel a la Tuberculosis, un proyecto en busca del comportamiento del agente infeccioso. *Conversus*, IPN, Núm 8 febrero 2002, pp. (16-19).
4. Secretaría de Salud, Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 Para la Prevención y control de la Tuberculosis en la atención primaria a la salud. *Diario Oficial de la Federación*, 31 de Octubre de 2000, Tomo DLXV, N° 22, México D.F, pp. (34-53).
5. Balandrano Campos Susana, Anzaldo Flores Georgina, Peña Flores Graciela Patricia, Betancourt Morillo Xiomara; Manual de procedimientos InDRE/SAGAR: 18 Tuberculosis; Secretaria de Salud, Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Organización Panamericana de la Salud, 1996, pp. (58-59, 66-71).
6. M. Hale Yvonne, E. Pfyffer Gaby and Salfinger Max; 2001; Laboratory Diagnosis of Mycobacterial infections: new tools and lessons learned. *Clinical Infectious Diseases* vol. 33:834-46
7. Ciencias Médicas, Boletín de la división de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM, Abril-Junio de 1995, Vol. 1, Número 4, pp. (5-43).
8. Instituto Mexicano del Seguro Social; Instructivo de Operación para el diagnóstico bacteriológico de tuberculosis y micobacteriosis, 1998, pp. (4-5, 7)
9. Perea Evelio J; Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica vol. II; Ed Doyma; Barcelona, España, 1992, pp. (754-766).
10. Volk Wesley A, Gebhardt Bryan M, Hammars Kjöld Marie-Louise, and Kadner Robert J; *Essentials of Medical Microbiology*; fifth edition; Lippincott-Raven Publishers; Philadelphia, 1996, pp (429-439).

11. Koneman Elmer W., Allen Stephen D., Janda William M, Schreckenberger Paul C and Winn Washington C; *Diagnóstico Microbiológico*; 5a Ed; Ed Panamericana; Buenos Aires, Argentina, 1999, pp (867-926).
12. Allen BW, Baker FJ; *Mycobacteria. Aislamiento, identificación y pruebas de sensibilidad*; Ed Manual Moderno; México DF, 1976, pp. (65-72).
13. *Epidemiología, Sistema Nacional de vigilancia epidemiológica. Num. 19 Vol.18 semana 19, del 6 al 12 de Mayo de 2001*
14. Lugo de la Fuente Gustavo; *Bacteriología Médica*; Ed Cuellar; México, DF, 1999, pp. (186-194).
15. Cabello Romero; *Microbiología y Parasitología Humana*; Ed. Panamericana; México, DF, 1993, pp. (323-326)
16. Universidad de las Naciones Unida; Programa de biotecnología para Latinoamérica y el Caribe (BIOLAC); Red Latinoamericana y del Caribe de Tuberculosis (Relactb); Curso internacional, La Paz, Bolivia, 1998, pp. (12-16).
17. Balows Albert, Hausler William J; *Manual clinical microbiology; fifth edition*; American Society for Microbiology; Washington DC, 1991, pp 1259, 1261-1262, 1296
18. Bollela VR, Sato DN and Fonseca BAL; 1999; McFarland nephelometer as a simple method to estimate the sensitivity of the polymerase chain reaction using *Mycobacterium tuberculosis* as a research tool. *Braz J Med Biol Res* 32(9): 1073-1076
19. MacFaddin Jean F; *Media for isolation cultivation-identification, maintenance of medical bacteria vol I*; Ed William and Wilkins; Baltimore/London 1985, pp (148-152, 458-464).
20. Kumate Jesús, Gutiérrez Gonzalo, Muñoz Onofre, Santos José Ignacio; *Manual de infectología clínica*; 15ª ed; Méndez editores; México DF, 1998, pp (167-181).
21. Behr MA, Warren SA, Salomón H, Hopewell PC, Ponce de León A, Daley CL, Smal PM; Transmisión of ***Mycobacterium tuberculosis*** from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *LANCET* 1999; 353:444-9
22. Siddiqui H; *Bactec Tb System. Product and Procedure manual*; Becton-Dickinson, 1989, pp. (VI/1-VI/4).

23. Murray R. Patrick, Manual of clinical Microbiology, sixth edition, 1995, pp 400-402
24. Jawets, Melnick y Adelberg, Microbiología Médica, 16° edición editorial: Manual moderno, México D.F, 1999, pp 343-355
25. García Rojas Alma Leticia, Determinación de cuenta viable en vacuna BCG Liofilizada por ensayo de una enzima. México D.F, ENCB, 1979.
26. Dirección General de Epidemiología Subdirección de Investigación y Evaluación Técnica Programa de Acción "Tuberculosis" 2002.
27. Comunicación Personal del Dr. Oscar Rojas Espinosa, Profesor de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB). Departamento de inmunología.
28. Robert H. Fletcher, Suzann W. Fletcher, MD. Edward H. Wagner, Epidemiología Clínica, editorial consulta, Barcelona España 1989 pp. (41-53).
29. MD. Stephen B. Muller, MD. Steven R. Gummings, Diseño de la Investigación Clínica un Enfoque Epidemiológico, ediciones; Dogma, México 1993, pp. (97-104).
30. Dr. Torres López J., PHD, Echanis Avilés G, D. en C., Parra Maldonado N.R., M. en C., Carlos Eslava, M. en C. José Molina, M. en C., Carlos Jesús Conde Gonzáles, D. en C. Laura Gisel Zamilpa Mejía, M. en C., Programa de Actualización Continúa en Infectología, Unidad 7, Laboratorio de Microbiología, Editorial Aventis, México 2001 -2002, pp. (396- 428).
31. Estadística del Sector Salud y Seguridad Social, Cuaderno N°. 17 18, edición; 2001; INEGI; Aguascalientes, México.
32. Universidad de las Naciones Unidas, Programa de Biotecnología Para Latinoamérica y del Caribe (BIOLAC); Red Latinoamericana y del Caribe de Tuberculosis (Relac Tb); Curso Internacional, La Paz Bolivia 1998, pp. (1-22).
33. Retledge Colin and Dale Jeremy; Mycobacteria, Molecular Biology and Virulence; Blackwell Science; Malden MA, USA, 1999; pp. 198-259).

34. WHO/TB/98.258, Los Servicios de Laboratorio en el Control de la Tuberculosis, Karin S  ller, Organización Mundial de la Salud, 1998, pp. (40).
35. Bailey y Scott's; Diagnostic Microbiology, 10^a edition: Mosby; USA, 1998, pp. (64-77).
36. Marques de Cantu Maria José, Probabilidad y Estadística Para Ciencias Químico-Biológicas, editorial; Mc Graw- Hill, México, 1991, pp. (361-387).
37. Epidemiología, Sistema Nacional de vigilancia epidemiológica. Num. 35 Vol.18 semana 35, del 26 de Agosto al 1 de Septiembre de 2001.
38. Epidemiología, Sistema Nacional de vigilancia epidemiológica. Num. 26 Vol.19 semana 26, del 23 al 29 de Junio de 2002.
39. Mac Faddin, Pruebas Bioquímicas Para la Identificación de las Bacterias de Importancia Clínica, editorial; Panamericana, México 1993, pp. (142-147).
40. Centro Panamericano de Zoonosis; Manual de Normas y Procedimientos Técnicos Para la Bacteriología de la Tuberculosis, Comité Asesor de la OPS/OMS en Bacteriología de la tuberculosis; Nota técnica N   27, El cultivo de ***Mycobacterium tuberculosis***, 1985, pp. (7-24).
41. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de validación de la Dirección General de Control de Insumos Para la Salud ,SSA, Comité Nacional de Validación, México, Agosto de 1990, pp.(3-47).
42. Hernández D.M,Garduño Juan, Hernández J.F.,Fajardo A., Mejía J.M., Martínez M. del C., Clasificación en Niveles de los Dise  os de Investigación Clínico- Epidemiol  gicos, Rev/Invest.Clin, Vol. 50/N  / Enero-Febrero 1998, pp. (79-86).
43. Catanzaro A., MD, Sharon Perry,EdM,PhD, Sherry Dunbar PhD, The Role of Clinical Suspicion in Evaluating a New Diagnostic Test For Active Tuberculosis, JAMA, February 2;2000, Vol. 283, N  5. pp. (639-645).
44. Donald A. Enarson MD, Controlling tuberculosis is it really feasible? Tubercle and Lung Disease, Vol.80, N   2, 2000, pp. (57-59).

45. William J. Burman and Randall R. Reves, Review of False-Positive Cultures for avoiding Unnecessary Treatment, *Clinical Infectious Diseases* 2000;31, pp. (1390-1395).
46. A'KOS SOMOSKÖVI, CSABA KÖDMÖN ,A'KOS LANTOS; Comparision of Recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the Automated BACTEC MGIT 960 System, the BACTEC 460 TB System, and Löwestein-Jensen Medium; *Journal of Clinical Microbiology*, June 2000, Vol. 30, N° 6, pp.(2395-2397).
47. A'KOS SOMOSKÖVI, PÁL MAGYAR, Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube With MB Redox, Löwestein-Jensen, and Middlebrook 7H11 Media, for Recovery of Micobacteria in clinical Specimens; *Journal of Clinical Microbiology*; May 1999, Vol.37,N°5, pp. (1366-1369).
48. Hipólito V. Niño, Luis A. Barrera, Garantía de Calidad en el Laboratorio Clínico, editorial; Panamericana, Bogotá Colombia, Marzo 1993, pp. (29 -39, 187-190, 354-358, 390).
49. Henry D. Isenberg; *Clinical Microbiology procedures Handbook*, Vol. 1, editor; in chief, 1992, pp. (3.12.14-3.12.17).
50. Difco Laboratories, Median and Reagents for Microbiology, Difco Tenth edition, Detroit Michigan 48232 USA, 1994, pp. (616-619).
51. Castillo de Sánchez ML, Fonseca Yerena M.E; *Mejoría Continua de la Calidad, Guía Para los Laboratorios clínicos de América Latina*, editorial; Editorial Médica Panamericana, México 1995, pp. (75-85).
52. Day Robert A; *Cómo escribir y publicar trabajos científicos*; 2ª ed; OPS, Washington, D.C. 1995. Publicación Científica N°.558.
53. Mims Cedric A. y otros; *Microbiología Médica*; Mosby/Doyma libros; Madrid, España 1995; pp 22.14-22.17.
54. Picazo Juan J, Casal Manuel; *Procedimientos en Microbiología Clínica. Capítulo 9: Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones por Micobacterias*; Barcelona, España, 1999.
55. Schluger Neil W. 2001. Changing approaches to the Diagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 164: 2020-2024.

56. Sharp Susan E, Lemes Maritza, Sierra Sandra, Poniecka Anna, and Poppiti Robert. 2000. Löwenstein-Jensen media. No longer necessary for Mycobacterial isolation. *Am J Clin Pathol* 113: 770-773.
57. Herzog Basel H. 1998, History of Tuberculosis, *Respiration* 65: 5-15.
58. Dye Christopher, Scheele Suzanne, Dolin Paul, Pathania Vikram and Raviglione Mario. 1999, Global burden of tuberculosis. Estimated incidence, prevalence and mortality by country. *JAMA* 282: 677-686.
59. Brändli Otto, 1998, the Clinical Presentation of Tuberculosis. *Respiration* 65: 97-105.
60. Salfinger Max, Hale Yvonne M and Driscoll Jeffrey R. 1998. Diagnostic tools in tuberculosis. Present and future. *Respiration* 65: 163-170.
61. Sebald M; Tacquet A et Bricout F; *Technique en bactériologie. 2. Anaerobies. Micobacteries. Virologie ; 6^a ed ; Flammarion medecine-Sciences ; Paris 1973 : pp (136-141).*
62. Bloom Barry R; *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control; American Society for Microbiology; Washington, D.C; 1994, pp (353-380).*
63. Rico Méndez Gerardo, Montero Mora Patricia; *Inmunología Pulmonar Básica; Trillas; México, DF; 1991; pp. (268-278).*