



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

48



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

## DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE FACTORES DE CRECIMIENTO E INHIBIDORES PARA EL MEDIO DE CAPA DELGADA

289057

TÉSIS

*QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:*

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

*Presenta*

**MARÍA DEL CARMEN MORENO OLMOS**

Asesores:

M. en C. Nélida Ruth Parra Maldonado.

Q. F.B. Patricia Vidal Millán.

México D.F

Marzo del 2001.



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.

**Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI y en la Unidad de Neumología del Hospital General de México.**

## AGRADECIMIENTOS

### *A MIS PADRES:*

Jesús y Teresa por creer en mí y por darme su apoyo para realizar una de mis más grandes metas.

### *A MIS HERMANOS:*

Gabriel y José por los momentos compartidos.

### *A MIS ABUELAS:*

Carmen y Josefina por los consejos y apoyo dados.

### *A MI TÍO:*

Paco por su ayuda incondicional en los instantes precisos.

*A MIS ASESORES:*

Dra. Ruth por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

Prof. Patricia Vidal por su ayuda.

Al Dr. Javier Torres y a todo el personal que trabaja en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría. CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI.

Al Q. Francisco Salinas y a todo el personal que labora en el laboratorio de Neumología del Hospital General de México.

*A MIS AMIGOS:*

Greta y Enrique por su amistad.

*Gracias.*

## INDICE

	<b>Páginas</b>
Resumen	1
Generalidades	2
Antecedentes históricos	4
Desarrollo de medios de cultivo	5
Epidemiología	7
Patogenia	10
Tratamiento	11
Diagnóstico	12
Fundamentación teórica	15
Planteamiento del problema	17
Objetivos	18
Hipótesis	19
Diseño Experimental	20
Material y métodos	21
Metodología	24
Diagramas de flujo	28
Resultados	32
Discusión de Resultados	53
Conclusiones	57

## RESUMEN

La tuberculosis ha resurgido hasta el punto de ser considerada una de las principales causas de muerte por procesos infecciosos a nivel mundial. Su diagnóstico requiere del cultivo, el cual para obtener resultados tarda entre 4-8 semanas para la observación de colonias a simple vista en métodos tradicionales. Por lo que en este trabajo el microcultivo puede ser una opción para el diagnóstico oportuno, más aún logrando un medio de cultivo idóneo por la adición de factores de enriquecimiento y de antibiótico.

El efecto de los productos naturales suero de caballo, líquido de ascitis y agua de coco en la promoción del desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis* en microcultivo, se valoró por el número de colonias recuperadas a partir de un inóculo estándar de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv y por el tiempo de incubación necesario para la presencia de colonias.

La observación de colonias se manifestó a partir del 9 día, con un 17.5% y 15.2% de recuperación en los cultivos SC y OADC respectivamente. Considerando el 100%, el número total de colonias observadas al final del periodo de incubación de 21 días en el medio OADC (estándar). En los medios con líquido de ascitis y agua de coco el desarrollo fue más tardío y la recuperación menor, para el líquido de ascitis a los 12 días se tuvo un 9.4% de recuperación, mientras que en el cultivo con agua de coco fue necesario 15 días con sólo el 3.3% de desarrollo.

Los resultados obtenidos fueron muy similares en el No. de colonias para todos los tiempos de observación en los medios con SC y OADC probados independientemente, en tanto cuando se adicionó ambos enriquecimientos en el mismo medio de cultivo, el No. de colonias no fue mayor pero si el desarrollo se anticipó a los 7 días.

Para incrementar el carácter selectivo del medio de cultivo, se aumentó la concentración de anfotericina B hasta el doble de lo previamente utilizado, sin encontrar un efecto nocivo para el *Mycobacterium tuberculosis*.

El rendimiento 17/71(24%) en la recuperación del medio estándar y suero de caballo en el primoaislamiento fue similar para los dos medios. De acuerdo a los resultados obtenidos, el microcultivo en Capa Delgada con el medio enriquecido con suero de caballo puede ser una alternativa aplicable en forma paralela a los métodos de cultivos convencionales para países de alta incidencia de tuberculosis y poco presupuesto, con las ventajas de un desarrollo temprano y la disponibilidad inmediata del enriquecimiento.

## GENERALIDADES

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa causada por el complejo tuberculosis que incluye las especies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum*.

Tanto el *Mycobacterium tuberculosis* como el *Mycobacterium bovis* pertenecen al orden Actinomycetales familia *Mycobacteriaceae*<sup>(1)</sup>.

Las micobacterias son procariotes, cuya pared celular esta compuesta por los ácidos micólicos (ácidos grasos ramificados hidroxilados) que están unidos por dos tipos de polímeros, el arabino galacto micolato y el peptidoglicano.

La composición molecular es la responsable de la muy escasa permeabilidad de la pared celular y, por tanto de la ineficacia de la mayor parte de los antibióticos frente a estos microorganismos.

Aproximadamente 20 a 40 % del peso seco de las micobacterias son lípidos de la pared celular. Además los lípidos como las trehalosas aciladas (6,6 dimicolato de trehalosa), identificado en la mayoría de las micobacterias como el llamado factor cordón o de acordonamiento funciona como tóxico, por lo que tiene que ver con la virulencia de las cepas. Por este factor algunas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* crecen como "cuerdas o trenzas" en medios líquidos.

Otras moléculas de la pared de las micobacterias, el lipoarabinomano, está implicado en la interacción patógeno-huésped y facilita la supervivencia de *Mycobacterium tuberculosis* en el interior de los macrófagos<sup>(2)</sup>.

El *Mycobacterium tuberculosis* son bacilos delgados, ligeramente curvados, aerobios, no esporulados, no capsulados e inmóviles y que miden aproximadamente de 1 a 4µm de longitud por 0.3 - 0.5 µm de diámetro. Las micobacterias, incluida *M. tuberculosis*, se tiñen con facilidad con la técnica de Ziehl Neelsen (fucsina fenicada con calor) y cuya decoloración no es fácil aún con alcohol acidificado (ácido-alcohol resistencia), esta última es su principal característica y se debe a la composición de la pared celular, rica en lípidos complejos ramificados de alto peso molecular.

El *Mycobacterium tuberculosis* tiene la capacidad de acumular niacina, reducir nitratos y carece parcial o totalmente de actividad de catalasa a 68°C<sup>(2)</sup>.

Las micobacterias cubren una amplia gama de posibilidades en relación Huésped - Parásito con el hombre, desde parásitos obligados como en el caso de lepra, hasta micobacterias saprófitas.

Estas micobacterias comprenden un grupo creciente de especies, actualmente hay reportes de 54 especies, de las cuales aproximadamente 25 están relacionadas con las infecciones humanas<sup>(4)</sup>.

El mecanismo fundamental de transmisión de la tuberculosis es por vía aérea, siendo la forma pulmonar la más frecuente, pero también puede afectar a los otros órganos. El curso de la enfermedad es progresiva y crónica, puede conducir a la muerte si el paciente no recibe tratamiento, según estudios realizados, se concluye que el 50% de los enfermos con tuberculosis pulmonar muere, después de 5 años de no recibir tratamiento, el 25% continúan crónicos y el 25% curan espontáneamente<sup>(1)</sup>.

## ANTECEDENTES HISTORICOS

La tuberculosis es considerada una de las enfermedades implacable que ha enfrentado el hombre a través de la historia. Existe evidencia paleontológica de tuberculosis espinal en restos neolíticos precolombinos y egipcios.

Los asirios y babilonios de los siglos VI y V a. C interpretaban en ella la ira de Dios. Hipócrates (460 - 370 a. C.) fue quien le dio el nombre de tisis a esta enfermedad, ya que según él se debía a "hemorragia de los pulmones". Galeno escribió acerca de su naturaleza contagiosa y recomendó el aislamiento de los enfermos y la estancia de ellos al aire libre<sup>(5)</sup>.

Durante la revolución Industrial y el período de urbanización que acompañó a la misma en los siglos XVII y XVIII, la tuberculosis fue responsable de una cuarta parte de todas las muertes en adultos que se produjeron en Europa<sup>(6)</sup>.

Las características de la enfermedad ya eran "conocidas" pero no se tenía "conocimiento" de su etiología. El concepto que se tenía de este mal, en épocas pasadas quedó reflejado en palabras de Dickens " He aquí una enfermedad de paso lento y solemne, con un desenlace sumamente cierto ".

Los logros médicos sobresalientes fueron desarrollados en la segunda década del siglo XIX, Laennec realizó estudios de autopsias y observó que tanto las formas de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar, consideradas hasta entonces no relacionadas formaban parte de la misma enfermedad. Por lo que en 1865 Françoise Villemin demostró por medio de inoculación a conejos que la tuberculosis podía ser transmitida utilizando filtrados de tejido enfermos.

El acontecimiento más importante fue el que se descubrió en 1882 por Roberto Koch, quien confirmó la hipótesis infecciosa de la tuberculosis al descubrir el agente causal, el bacilo que lleva su nombre, y que se denomina "*Mycobacterium tuberculosis*".

Para 1924 se creía en la posibilidad de erradicar la tuberculosis con el desarrollo de la vacuna con el bacilo Calmette y Güerin (BCG) y aún más con el descubrimiento de la estreptomycin por Waskman en 1943, misma que Hinshaw y Feldman aplicaron como tratamiento, con esto se inició una nueva etapa de una serie de compuestos que conformarían una efectiva terapia farmacológica para el manejo de la enfermedad.

## DESARROLLO DE MEDIOS DE CULTIVO

Con la introducción de medios de cultivos sólidos se inició una auténtica revolución en la bacteriología, haciendo posible su florecimiento en las dos últimas décadas del siglo XIX, durante las cuales se produjo el aislamiento y caracterización de los organismos causantes de la mayoría de las infecciones bacterianas.

El trabajo inicial para la obtención de cultivos puros fue realizado por Brefeld, estos medios funcionaban admirablemente para los hongos, pero no resultaban adecuados cuando se aplicaban a las bacterias que eran más pequeñas. Una manera más prometedora de abordar el problema había sido ya sugerida por Schroeter quien encontró que sobre substratos sólidos tales como patatas, pasta de almidón, pan y albúmina de huevo se formaban colonias aisladas.

Koch realizó el primer medio sólido, utilizando la superficie de una patata cocida que, tras cortarla con un cuchillo esterilizado las inoculaba con bacterias. Sin embargo este método tenía varias desventajas, el substrato era opaco por lo cual resultaba difícil de observar las colonias, además la patata no era un buen medio nutritivo para muchas bacterias<sup>(7)</sup>.

El medio líquido conocido, como caldo nutritivo, y gelatina como agente endurecedor, fueron utilizados por Koch, quien inoculaba este medio una vez solidificado. Estas placas de gelatina resultaban muy provechosas y permitieron obtener colonias individuales, pero presentaban una gran limitación, no se podía cultivar a 37°C, puesto que la gelatina funde a esa temperatura<sup>(8)</sup>.

Posteriormente se introdujo el agar, que por su peculiar punto de fusión, enfriamiento, su escaso valor nutritivo y la carencia de sustancias inhibitoras lo convierten aún hasta la fecha en la sustancia ideal para la solidificación de medios de cultivo.

En 1882 Koch realizó un medio a base de suero coagulado, en donde el suero fue extraído de ganado bovino y colocado en tubos de ensaye tapados con algodón, se calentaban a una temperatura de 58°C durante 6 días subsecuentes, después era calentado a 65°C por varias horas o durante el tiempo necesario para lograr que se solidificara por coagulación. En este medio se obtuvo el crecimiento óptimo de bacterias patógenas<sup>(8)</sup>.

Hacia finales del siglo XIX se empezó a mejorar los medios de cultivo, añadiendo componentes como medio de enriquecimiento como la glucosa, lactosa y peptona, así como también iniciaron la investigación del efecto de los colorantes sintéticos que son utilizados como inhibidores para medios selectivos, el verde de malaquita y el cristal violeta.

Se implementó el uso de medios de cultivo selectivos, tanto para líquidos como para sólidos, los primeros proporcionan un enriquecimiento de la población en lo que se refiere a los organismos que se desea aislar, mientras que los sólidos permiten su aislamiento directo.

El enriquecimiento del medio se basa en que los microorganismos son estimulados para su desarrollo por sustancias de fácil acceso a los ciclos metabólicos microbianos como el uso de un determinado azúcar que se convierte en la única fuente de carbono, sales amónicas como fuente de nitrógeno y aminoácidos para estimular el inicio del crecimiento e incrementar su velocidad de desarrollo<sup>(9)</sup>.

Hoy en día, el propósito de los medios de cultivo es respaldar el desarrollo de los microorganismos, además de exhibir una morfología colonial y microscópica típica, cualquier variación en la composición del medio puede alterar estas características. La prueba de "promoción del crecimiento" autoriza el trabajo únicamente con medios que se encuentran entre los límites tolerables, en atención al programa de control de calidad.

El Control de Calidad consiste en una evaluación sistemática del trabajo, para asegurar que el producto final se ajuste, a límites de tolerancia previamente establecidos.

Para obtener medios de óptima calidad, deben usarse productos químicos de calidad analítica certificada, material de vidrio limpio y agua recién destilada. Además mantener limpia la superficie de trabajo antes de preparar los reactivos y utilizar técnicas asépticas cuando se preparen los medios. Deben respetarse "estrictamente" las instrucciones sin modificación alguna<sup>(10)</sup>.

## EPIDEMIOLOGIA

A finales de los 50's la tuberculosis parecía una enfermedad prácticamente erradicada, pero el resurgimiento a nivel mundial que caracterizó a la década de los 80's con la aparición del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), convirtió a la tuberculosis en la primera infección oportunista de estos enfermos inmunodeprimidos, además el problema de farmacoresistencia también ha venido agravar el perfil de la tuberculosis, en donde la falta de seguimiento, el control de los programas y la falta de adhesión de los pacientes ha favorecido la presencia de cepas resistentes a los tratamientos convencionales.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró en 1993 a la tuberculosis como una emergencia mundial<sup>(1)</sup>.

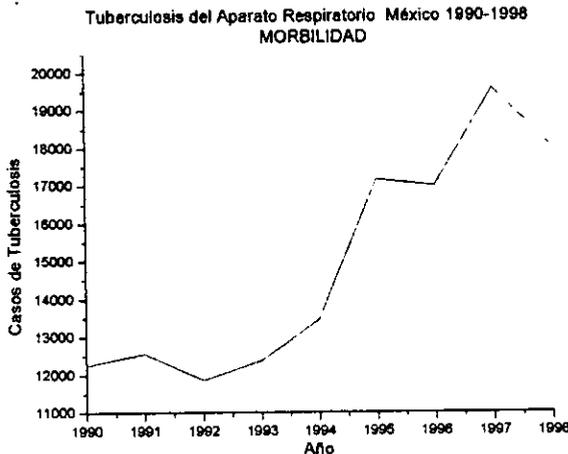
Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, 50 millones de ellos están infectados por cepas multidrogoresistente (Isoniacida y Rifampicina resistentes)<sup>(12)</sup>, cada año se demuestra una ocurrencia de más de 10 millones de casos nuevos y 3.5 millones de defunciones por tuberculosis<sup>(1)</sup>.

En México, nueve de cada 10 casos de tuberculosis corresponde a la forma pulmonar, la cual se ha incrementando en los últimos 5 años.

La mortalidad por tuberculosis en 1999 se encontró dentro de las primeras veinte causas de muerte en el país.

De 1993 a 1998 se apreció un incremento del 24% en el número de casos de tuberculosis pulmonar y en las tasas de morbilidad al pasar de 14 a 18.7 casos por cada 100,000 habitantes. <sup>(1)</sup> v. Fig 1

Fig. 1



Fuente: Sistema único de información para la Vigilancia Epidemiológica  
Información Preliminar. Proceso DGE

Fig. 2

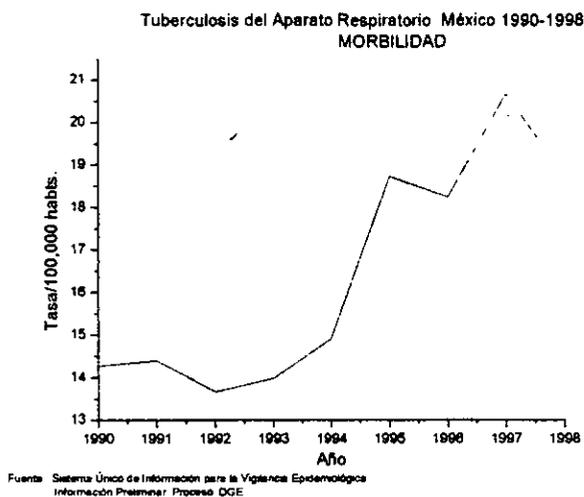
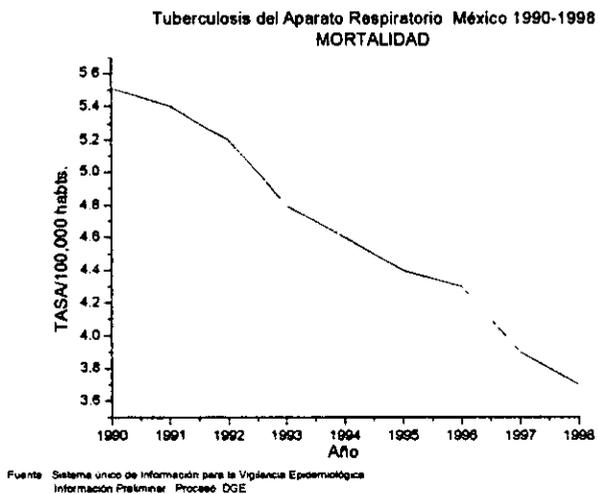


Fig. 3



En México la tuberculosis es una enfermedad endémica, la mortalidad presenta un patrón geográfico de concentración de las tasas más altas en el Sur, Golfo de México y algunas entidades en el norte del país.

**Cuadro 1.** Casos de Tuberculosis Pulmonar por Entidad Federativa acumulado hasta Julio Semana 30 del 2000.

	<b>Entidad</b>	<b>Acumulado en el 2000</b>	<b>Acumulado en 1999</b>
1.-	Veracruz	1102	1155
2.-	Tamaulipas	672	487
3.-	Guerrero	642	586
4.-	Nuevo León	606	659
5.-	Chiapas	581	846
6.-	Baja California	437	478
7.-	Jalisco	389	489
8.-	Estado de México	375	400
9.-	Oaxaca	345	461
10.-	Sinaloa	341	427

*Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Información preliminar. Procesó: DGE.*

Los grupos más afectados por tuberculosis pulmonar son los mayores de 15 años, siendo los de 25 a 64 los que presentan el riesgo más alto de enfermar<sup>(1)</sup>.

Varios factores han creado condiciones propicias para su recrudecimiento como la aparición del SIDA, pobreza cada vez más acentuada, crecimiento de poblaciones marginadas, intensos movimientos migratorios en busca de una mejor calidad de vida, difícil acceso a los servicios de salud y la aparición - diseminación de cepas resistentes.

La tuberculosis es consecuencia de distintos factores, además de la edad y de determinados factores sociales, ciertas características genéticas podrían favorecer el desarrollo de la tuberculosis, como ocurre en las personas de raza negra que tienen una especial propensión a padecer tuberculosis, también la enfermedad es más común en gemelos monocigotos que dicigotos y más frecuente entre las personas portadoras del antígeno de histocompatibilidad HLA-Bw15, aunque no siempre es fácil separar estos factores de otros de tipo ambiental o económicos.

## PATOGENIA

La infección inicial o primoinfección tuberculosa se produce cuando los bacilos tuberculosos (al parecer 1-3 bacilos serían suficientes) consiguen alcanzar los alvéolos pulmonares. Estas bacterias, quizá por efecto sólo mecánico, alcanzan preferentemente los lóbulos más declives que son los inferiores, aunque también pueden afectar al lóbulo medio, la lingula y los lóbulos superiores. Desde estas áreas la infección puede quedar contenida en el pulmón o diseminarse a distintos puntos del organismo. La lesión inicial pulmonar que se produce tras la infección suele ser periférica. Desde allí, los bacilos tuberculosos sufren una depuración por el sistema linfático pulmonar y la infección drena hacia los ganglios del hilio pulmonar. Si la infección queda contenida aquí, sólo habrá una lesión cicatrizal pulmonar, no siempre visible en la radiografía de tórax, y una adenopatía hiliar que pueden calcificarse, dando lugar a lo que se conoce como "complejo de Ghon". En otras ocasiones la infección, en lugar de quedar limitada a los ganglios, se extiende por vía hematogena a otras áreas del pulmón y a otros órganos (diseminación hematogena). En el pulmón, la infección afectará, sobre todo, los segmentos posteriores de los lóbulos superiores, ya que *Mycobacterium tuberculosis* es un microorganismo aerobio con preferencia por las áreas pulmonares mejor ventiladas<sup>(6)</sup>.

Lo que suceda después de esa diseminación hematógena inicial dependerá de los dos factores que gobiernan siempre la infección tuberculosa: por un lado, el tamaño del inóculo bacteriano y, por otro, la respuesta inmunitaria del huésped.

En ciertos huéspedes, especialmente niños de corta edad y ancianos, el paciente desarrollará durante la diseminación hematogena graves cuadros clínicos, en forma de meningitis o de tuberculosis miliar. Lo más frecuente, sin embargo, es que los mecanismos inmunes del huésped sean capaces de contener esta infección, a pesar de que se haya diseminado.

En este caso, el paciente sólo referirá una sintomatología leve sin desarrollar enfermedad tuberculosa. Tanto en el pulmón como en los restantes órganos, las lesiones tuberculosas diseminadas durante este período de primoinfección cicatrizarán como lo hizo la lesión pulmonar inicial pero continuarán siendo fuentes potenciales de reactivación de la enfermedad, ya que *Mycobacterium tuberculosis* puede persistir viable intracelularmente durante muchos años. Todo individuo con infección, es decir, que entró en contacto con *M. tuberculosis*, corre el riesgo de desarrollar enfermedad, es decir síntomas de tuberculosis, en cualquier momento de su vida siempre que se reactive la infección. Aunque hasta ahora se consideraba un hecho excepcional, es posible que los pacientes se reinfecten por cepas de *M. tuberculosis* diferentes de la que causó la infección inicial<sup>(6)</sup>.

## TRATAMIENTO

El tratamiento de la tuberculosis constituye parte del programa de Control y Prevención de la tuberculosis, el cual tiene como meta ingresar a todos los pacientes diagnosticados en la baciloscopia y en el cultivo. Este tratamiento tendrá que proporcionarse al paciente independientemente de su derechohabencia a cualquier institución de salud del país. Aunque el tratamiento es complejo y prolongado se debe administrar los medicamentos en forma supervisada con pleno convencimiento y cooperación del enfermo, vigilar la aparición de efectos indeseables y establecer un mecanismo de comunicación con el paciente con el fin de motivarlo para evitar que abandone el tratamiento, lograr su curación, reintegrar al paciente a la sociedad y al trabajo y con ello reducir las fuentes de infección lo que a mediano plazo permitirá reducir la morbilidad por tuberculosis, siendo esta última la meta propuesta para mejorar la situación de la tuberculosis en el país.

Cuando se diagnóstica por primera vez a un paciente con tuberculosis, este debe ingresar a Tratamiento Primario Acortado Estrictamente Supervisado (TAES), lo cual tiene la probabilidad de curarse en un 98% aproximadamente<sup>(1)</sup>.

El tratamiento primario acortado estrictamente supervisado (TAES) de la tuberculosis incluye los siguientes medicamentos: Isoniacida (H), Rifampicina(R) y Pirazinamida(Z). Este tratamiento tiene dos esquemas; el primario de corta duración y el primario reforzado. El primero requiere 2 fases: la primera o intensiva que es diario de Lunes a Sábado hasta completar 60 dosis, dura 10 semanas y, la segunda o de sostén se administra tres veces por semana (Lunes, Miércoles y Viernes) hasta completar 45 dosis, dura 15 semanas<sup>(1)</sup>.

El tratamiento primario reforzado es administrado en pacientes con tuberculosis del sistema nervioso central y miliar (diseminada), y con enfermedades asociadas como diabetes mellitus, o infección por VIH, con tratamiento inmunosupresor o que haya abandonado o recaído por segunda ocasión. Este tratamiento es a base de combinación fija de Isoniacida, Rifampicina y Pirazinamida más Etambutol o Estreptomina, consta de dos fases: la primera o intensiva es diaria de Lunes a Sábado hasta completar 72 dosis y la segunda de sostén es intermitente 3 veces por semana hasta completar 72 dosis a excepción del Etambutol que se administra diariamente<sup>(1)</sup>.

## DIAGNÓSTICO

La tuberculosis pulmonar es la forma clínica más importante por su frecuencia y porque constituye la fuente de infección para la comunidad.

Aunque las formas clínicas de tuberculosis extrapulmonar son de lo más variadas numérica y epidemiológicamente, pero también son importantes ya que ocasionan cuadros clínicos no específicos de acuerdo al sistema u órgano afectado.

Por lo que el diagnóstico de la tuberculosis depende en gran medida de la comprobación bacteriológica en las muestras clínicas<sup>(3)</sup>. La utilidad y el alcance de las diversas técnicas dependerá de la situación epidemiológica prevaleciente y de los recursos disponibles en cada país. Así en México la baciloscopia es el método de diagnóstico más utilizado en los laboratorios. Cuadro 2.

**Cuadro 2. Métodos de Diagnóstico de Tuberculosis en México**  
Semana 30, Julio del 2000

Método de Diagnóstico	%
Baciloscopia	73 %
Cultivo	2 %
Otros	20 %
Histopatología	4 %
Ignorado	1 %

*Fuente: Sistema único de Información para la Vigilancia Epidemiológica EPI- TP.*

*Procesó : DGE.*

A pesar de los avances que se han logrado en los últimos años en la micobacteriología, actualmente el 90% de los casos son diagnosticados por microscopía, esta técnica es sencilla rápida y de bajo costo ya que permite detectar los casos infecciosos de tuberculosis pulmonar, es decir, aquellos que perpetúan la infección en una comunidad. Para que el diagnóstico por microscopía directa sea positivo es preciso que la muestra de esputo contenga entre 5,000 y 10,000 bacilos de la tuberculosis por mililitro de esputo<sup>(3)</sup>. El examen microscópico también se utiliza para evaluar la respuesta al tratamiento en tuberculosis pulmonar y determinar la curación, o el fracaso cuando aquel ha concluido<sup>(1)</sup>.

Pero por su baja sensibilidad, en muestras de tuberculosis extrapulmonar y de tuberculosis en niños, el diagnóstico necesita complementarse con el cultivo, y aún más en casos de tuberculosis extrapulmonar y en enfermedades causadas por micobacterias que no son bacilos de la tuberculosis.

Para el reconocimiento del morfotipo de micobacterias se emplean métodos de tinción, que permiten su rápida visualización en muestras clínicas.

La técnica de Ziehl - Neelsen demuestra la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en la que se emplea el colorante fucsina fenicada aplicada con calor, decolorada con alcohol-ácido y contrastada con azul de metileno.

La tinción de Kinyoun es similar a la de Ziehl Neelsen, pero no utiliza calor para favorecer la captación de la tinción. Esta técnica se denomina método en frío porque utiliza un detergente activo de superficie (tergitol).

Las técnicas de fluorocrómicas (técnica de Truant) con auramina - rodamina permiten una rápida y más cómoda visualización de las micobacterias, ya que muestran una llamativa fluorescencia amarilla anaranjado cuando se observan con microscopio de fluorescencia, este método tiene una mayor sensibilidad que la de Ziehl-Neelsen, Cualquiera de estas técnicas *Mycobacterium tuberculosis* se observa como un bacilo de 1 a 4µm de longitud por 0.3- 0.5µm de diámetro.

El diagnóstico definitivo de tuberculosis sólo puede establecerse cuando se cultiva y recupera *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, existen otras pruebas diagnósticas, que se expondrán a continuación, y que ayudan a plantear el diagnóstico de esta enfermedad.

Se han hecho muchos intentos para mejorar los métodos de cultivo del bacilo tuberculoso, de modo que se puedan disponer de sus resultados en plazos más breves. Las técnicas más útiles a este respecto parecen ser las que detectan la presencia de micobacterias por su metabolismo, los radiométricos con los que se tiene mayor experiencia como el sistema BACTEC 460 TB, este sistema hace uso de un medio líquido que contiene ácido palmítico radioactivo marcado con carbono 14, como fuente de carbono. El crecimiento de la bacteria es detectado midiendo la liberación de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir del substrato marcado. Este método tiene la ventaja de ser más rápido con un rango de 5-12 días para la obtención de resultados, aunque los grandes inconvenientes son su alto costo, el manejo de los desechos radioactivos y la necesidad de un lector automatizado para hacer las lecturas<sup>(2)</sup>.

El sistema MGIT es un método rápido para la detección (7-12 días) y pruebas de susceptibilidad a drogas de *Mycobacterium tuberculosis*. Este sistema se basa en el uso de un compuesto indicador fluorescente que recubre el fondo del tubo, sensible a la presencia de oxígeno disuelto en el medio, conforme las bacterias presentes en el medio respiren activamente, el oxígeno es consumido permitiendo de esta manera que la fluorescencia del indicador sea visible al iluminar el tubo desde la parte inferior con una lámpara de Wood (365nm)<sup>(13)</sup>.

Los avances logrados en los últimos años en el campo de la Biología Molecular han permitido el desarrollo de métodos más rápidos de detección de *Mycobacterium tuberculosis*, como la técnica de PCR.

Aunque los primeros datos son ciertamente prometedores la aplicabilidad real de esta técnica en el diagnóstico convencional de la tuberculosis está todavía por definirse.

Otras técnicas que se sirven también de la PCR pueden ser útiles en el futuro para la detección precoz de cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* y para el seguimiento epidemiológico de ciertos brotes de la enfermedad.

Existen comercialmente técnicas serológicas que pueden contribuir al diagnóstico de tuberculosis, si bien hasta ahora no se ha generalizado el uso de ninguna de ellas.

Los métodos serológicos de diagnóstico se fundamentan en la producción de anticuerpos por los pacientes, al tener una infección clínica activa de *Mycobacterium tuberculosis* como la técnica de Elisa. En este procedimiento el antígeno se fija a una fase sólida de plástico, se incuba con el suero de los pacientes y la detección de anticuerpos se realiza por un anticuerpo específico conjugado a una enzima, al adicionarse el sustrato de la enzima se producirá color, el cual se mide en un espectrofotómetro<sup>(14)</sup>.

La cuantificación de la enzima adenosindesaminasa (ADA) en ciertos líquidos corporales puede tener cierta utilidad para diagnosticar tuberculosis, aunque la prueba carece de suficiente especificidad.

Mediante la cromatografía puede identificarse los componentes lipídicos de la pared celular característico de cada micobacteria. Este método parece ser muy específico y bastante sensible, pero hasta el momento es poco práctico, ya que solo está disponible en los laboratorios de referencia.

Todos estos métodos de diagnóstico se basan en procedimientos técnicamente laboriosos y en el uso de equipos de laboratorio no siempre disponibles en los países más afectados por la enfermedad, ya que por su alto costo sería imposible su utilización de manera rutinaria.

## FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica causada por el complejo tuberculosis.

Esta enfermedad constituye uno de los problemas de salud pública más grave del momento actual, por lo que se requiere disponer de metodología adecuada para los países de alta incidencia y bajos recursos.

En México se ha logrado el Consenso Institucional de Sector Salud, para el programa de control fijando como objetivos: Conocer la magnitud de la enfermedad, Reducir la transmisión de la enfermedad y Disminuir la mortalidad.

Cualquiera de estos objetivos requiere del apoyo del laboratorio de Microbiología, pero actualmente el 90% de los casos son diagnosticados por microscopía, método que es el idóneo para la búsqueda de casos infecciosos, pero su baja sensibilidad en muestras de tuberculosis extrapulmonar y en tuberculosis infantil, por lo que el diagnóstico necesita complementarse con el cultivo.

El cultivo constituye el único método de diagnóstico definitivo de la tuberculosis mucho más sensible y específico en comparación con la baciloscopia ya que permite detectar y aumentar eficientemente entre un 30 y un 50% casos de tuberculosis.

Asimismo, posibilita la detección en pacientes con sospecha clínica y radiológica de tuberculosis pulmonar, con resultado negativo de seis baciloscopias en esputo, también en casos de sospecha de tuberculosis de localización extrapulmonar, en tuberculosis en niños. Además, en pacientes sujetos a tratamiento estrictamente supervisado y que, al tercer mes, persistan mostrando baciloscopias positivas, en pacientes con fracaso terapéutico y para vigilancia de la farmacoresistencia o con motivo de investigaciones epidemiológicas, terapéuticas y bacteriológicas se requiere el cultivo<sup>(1)</sup>.

Para el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* se tiene medios comerciales tanto líquidos como sólidos, dentro de los primeros tenemos a los medio líquido Middlebrook 7H9 y Dubos de Albúmina, que son comúnmente utilizados para subcultivar cepas de referencia de micobacterias, así como también para pruebas de aislamiento, sensibilidad a drogas y otras pruebas in vitro.

En cambio los medios sólidos preparados a base de huevo, glicerol, asparagina y verde de malaquita como el Löwenstein-Jensen y el Stonebrick, los cuales son los más utilizados en el laboratorio de rutina, ya que son fáciles de preparar, baratos y aseguran un buen crecimiento de los bacilos de la tuberculosis.

Además que ambos son útiles en muestras no estériles (esputos, lavados bronquiales, lavados gástricos, y orinas) previamente descontaminadas, y en muestras estériles (líquido cefalorraquídeo, líquido pleural y de ascitis).

Los medio de Löwenstein-Jensen y Stonebrick pueden almacenarse en el refrigerador durante cuatro semanas siempre y cuando los tubos se cierren herméticamente, para reducir al mínimo el secado por evaporación.

Las limitantes de esta técnica son el largo período de incubación requerido para la observación de colonias que es de 4 - 8 semanas, y en algunos casos aún a las 12 semanas se han logrado recuperar las colonias.

El medio Middlebrook 7H10 y 7H11, ambos se preparan a partir de una base de agar 7H10 disponible comercialmente, esta base contiene sales y vitaminas, al medio se le adiciona suplementos de enriquecimiento compuesto por ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC) y antibióticos para prevenir la contaminación.

Cuando se usan estos dos medios (Middlebrook 7H10 y 7H11) para aislar los bacilos de la tuberculosis, las muestras no estériles (esputos, lavados bronquiales, gástricos y orina) deberán llevar a cabo la digestión y descontaminación con el método de NALC-NaOH (N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio) estos cultivos deben incubarse en una atmósfera de CO<sub>2</sub>.

Este medio de cultivo sólido y transparente permite observar el desarrollo de microcolonias en etapas tempranas de 7 - 12 días con morfología sugestiva de *Mycobacterium tuberculosis*, además de que es un medio con menos probabilidad de contaminación, por el proceso de descontaminación que fueron sometidas las muestras y por los antibióticos que se le adiciona al medio de cultivo.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis es uno de los problemas de salud pública más importante del país. En México cada año se diagnostican 18,000 casos nuevos en promedio<sup>(1)</sup>, siendo la forma pulmonar la más frecuente. El contagio ocurre generalmente en el ambiente intradomiciliario favorecido por el hacinamiento en que vive el enfermo, la desnutrición, enfermedades concomitantes como la diabetes, la carencia de educación para la salud y la falta de atención médica oportuna.

El verdadero impacto en el control de la tuberculosis es: eliminar el foco de infección por la aplicación del tratamiento hasta la curación de los pacientes pulmonares bacilíferos como consecuencia de la comprobación bacteriológica. De los métodos bacteriológicos tradicionales, la baciloscopia proporciona una amplia información en la búsqueda de casos bacilíferos entre los sintomáticos respiratorios lo cual es una prioridad en los países de alta incidencia.

La baja sensibilidad de este método se compensa en el esputo, que es el único producto biológico rico en bacilos (5,000 a 10,000 /ml)<sup>(3)</sup>. Otras ventajas de la microscopía son su bajo costo, el corto tiempo para obtener resultados y por lo mismo de alta cobertura.

Si bien la microscopía cumple con el cometido de identificar a los casos más infecciosos, el cultivo es requerido en pacientes con caso de sospecha clínica y/o radiológica de tuberculosis pulmonar con resultado negativo de seis baciloscopias en esputo y con tuberculosis extrapulmonar, de tal manera que se requiere de él, para incrementar la detención de enfermos.

El cultivo convencional permite que entre la 3<sup>ra</sup> - 4<sup>ta</sup> semana la detección de micobacterias por la presencia de colonias observadas a simple vista. Por lo que el microcultivo puede ser una opción para el diagnóstico oportuno, más aún logrando un medio de cultivo idóneo por la adición de factores de enriquecimiento que ya han demostrado su utilidad (suero de caballo, líquido de ascitis y agua de coco), para el desarrollo de las micobacterias, pero carecen de una validación cuantitativa de un protocolo de Control de Calidad, ya que los ensayos previos sólo se basan en la comparación en Löwenstein - Jensen y en microcultivo.

El sistema de Control de Calidad del cultivo tiene como parte fundamental el estudio de la "promoción del crecimiento", con el objeto de demostrar la habilidad del medio de cultivo para el desarrollo de microorganismos para los cuales fueron diseñados. En micobacterias la garantía del medio de Löwenstein - Jensen esta dada por la cuantificación del desarrollo de un inóculo estándar de la cepa de referencia de *Mycobacterium tuberculosis H<sub>37</sub>Rv No. 27294*.

La "promoción del crecimiento" se realiza en términos cuantitativos y permite seleccionar las variantes idóneas, incluidas en el estudio en la modificación a la fórmula del medio de cultivo.

## OBJETIVOS

- \* Determinar las concentraciones óptimas de antibiótico y factores de crecimiento para el microcultivo de *Mycobacterium tuberculosis* en capa delgada.
- \* Evaluar el efecto estimulante de distintos factores de enriquecimiento naturales como: líquido de ascitis, suero de caballo y agua de coco.
- \* Determinar efecto aditivo de los enriquecimientos, con el TL7H11(OADC)+ productos naturales.
- \* Establecer las máximas concentraciones de Anfotericina B tolerable por el *Mycobacterium tuberculosis*.

## HIPÓTESIS

La promoción del desarrollo de micobacterias en microcultivo en capa delgada, se mejora por la adición de factores de enriquecimiento naturales (líquido de ascitis, suero de caballo y agua de coco).

La tolerancia de *Mycobacterium tuberculosis* a la Anfotericina B permite incrementar la concentración de este antibiótico sin ninguna pérdida significativa del número de colonias de micobacterias recuperadas.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

Tipo de Estudio: Transversal Prospectivo (Estudio de prueba diagnóstica).

Población: Aleatoria.

Variable Independiente: Medios de cultivo.

Variable Dependiente: Crecimiento

## **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Cultivos de H37Rv con morfología colonial característica de *Mycobacterium tuberculosis* puro, en fase Logaritmica de crecimiento (4 semanas).

También se usaron sedimentos de pacientes que llegaron al laboratorio de Neumología del Hospital General de México con diagnóstico clínico de Tuberculosis pulmonar o extrapulmonar y que contaron con solicitud de comprobación bacteriológica por cultivo de micobacterias, así como los datos generales de los pacientes (Nombre, edad, localidad de origen, tipo de paciente de diagnóstico o control de tratamiento).

## **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Se excluirán todo cultivo contaminado a simple vista, también con morfología colonial diferente y cultivos con medio acidificado o alcalinizado.

## **MATERIAL**

Matraces ErlenMeyer 250, 500, 1000 ml.

Pipetas graduadas 2, 5 y 10 ml.

Cajas Petri de plástico desechables 50 x 20 mm.

Tubos de centrifuga de 50 ml.

Papel parafilm

Tubos de ensaye 13 x 100, 16 x 150, 18 x 125

Vasos de precipitado 250 ml.

Jeringas de plástico 1, 5 y 10 ml.

Micropipetas 5-50  $\mu$ l y 50-300  $\mu$ l

Gradilla

Varillas de vidrio

Pipetas Pasteur con bulbo

Viales de 50 ml.

Portaobjetos

Aplicadores de madera

Probetas graduadas de 50, 100 y 500 ml.

### **Medio de Cultivo**

Base de agar Middlebrook 7H10 Difco No. de Catálogo: 0627-01-2.

Hidrolizado de caseína Merck

Glicerol Sigma

Enriquecimiento OADC Becton-Dickinson

Medio de cultivo Löwenstein-Jensen

Líquido de Ascitis

Suero de Caballo

Agua de Coco

### **Antibiótico**

Ceftazidima Glaxo laboratories, LTD. Clave 475806.

Anfotericina B Elab Precimex S.A Clave de Lote 2012

Trimetoprim

### **Colorantes de Ziehl - Neelsen**

- Carbofucsina Harleco - Dade.
- Alcohol- Ácido Merck.
- Azul de Metileno Sigma.

Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 M/15

Fenol al 5%

Hidróxido de sodio 4%

Citrato trisódico  $3H_2O$  0.1M

N-acetil-L-cisteína

Cepa de Referencia de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv No. 27294.

## **EQUIPO**

- Autoclave Interamericana de Equipos.
- Balanza analítica Scientech modelo SA210.
- Estufa Lab Line Imperial 11.
- Centrifuga Beckman Modelo GS- 6.
- Placa de agitación y calentamiento Lab-Line.
- Campana de bioseguridad NUAIRE Clase 11 Tipo A/B3.
- Jarras de anaerobiosis BBL.
- Microscopio Carl Zeiss Modelo K7D.
- Agitador Fisher Vortex Scientific.

## **METODOLOGIA (1)**

### **1) Preparación del aditivo de Enriquecimiento Suero de Caballo**

- Separar el suero del coágulo.
- Centrifugar a 3000 revoluciones por minuto durante 15 minutos.
- Esterilizar por filtración el sobrenadante.
- Verter el suero en viales estériles.

### **2) Medio TL7H11 con Suero de Caballo**

- Preparar placas de capa delgada en cajas desechables de 50X 20 mm, con agar Middlebrook 7H10, suero de caballo al 10 % y antibióticos Anfotericina B, Ceftazidima y Trimetoprim 150µl..

### **1) Preparación del Aditivo de Enriquecimiento Líquido de Ascitis**

- Obtención de la muestra por personal médico.
- Centrifugar la muestra a 3000 revoluciones por minuto durante 20 minutos
- Esterilizar por filtración el sobrenadante.
- Colocar el líquido de ascitis en viales estériles.

### **2) Medio TL7H11 con Líquido de Ascitis**

- Preparar placas de capa delgada en cajas desechables de 50X 20 mm, con agar Middlebrook 7H10, líquido de ascitis al 10 % y antibióticos Anfotericina B, Ceftazidima y Trimetoprim 150µl..

### **1) Preparación del Aditivo de Enriquecimiento Agua de Coco**

- Filtrar el agua de coco.
- Esterilizar por filtración.
- Verter el agua de coco en viales estériles

### **2) Medio TL7H11 con Agua de Coco al 20 y 40%**

- Preparar placas de capa delgada en cajas desechables de 50X 20 mm, con agar Middlebrook 7H10, agua de coco al 20 y 40% y antibióticos Anfotericina B, Ceftazidima y Trimetoprim 150µl.

## METODOLOGIA (2)

- a) Mantenimiento de la Cepa de colección *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
- b) Siembra en Löwenstein - Jensen, incubar a 37°C durante 4 semanas.

### Preparación del inóculo

- c) Cosechar el cultivo de Löwenstein Jensen de 4 semanas.
- d) Suspender la masa bacilar en regulador de fosfatos.
- e) Dejar sedimentar durante 1 minuto.
- f) Transferir el sobrenadante a otro tubo de ensayo y ajustar la turbidez a la del tubo No.1 del Nefelómetro de Mac Farland
- g) Realizar dilución 1:2000

### Cultivo en capa delgada (TL7H11)

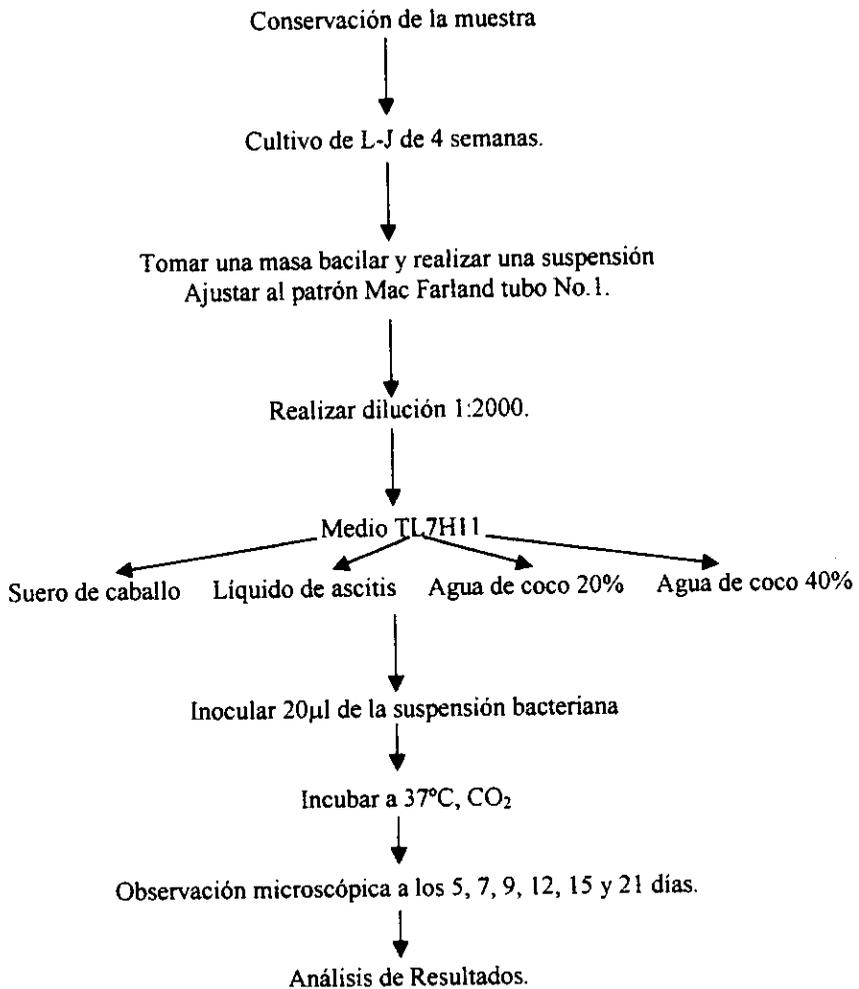
- h) Inocular 20µl de la suspensión bacteriana (H<sub>37</sub>Rv).
- i) Distribuir el inóculo en la superficie de los medios preparados, utilizando una varilla de vidrio en ángulo previamente esterilizada.
- j) Dejar en reposo 10 minutos, y sellar cajas con papel parafilm.
- k) Incubar a 37°C y mantener en CO<sub>2</sub> en una jarra de anaerobiosis.
- l) Observación microscópica con objetivo 10X a los 5, 7, 9, 12, 15 y 21 días

### Análisis de Resultados

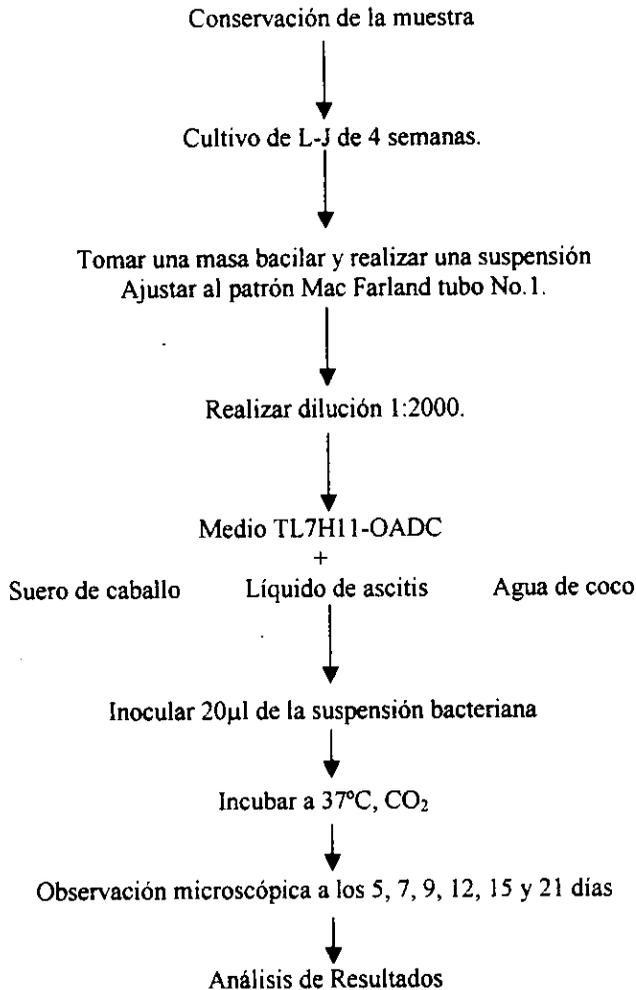
- m) Registrar el número promedio de colonias en 5 cm<sup>2</sup>, en la superficie del medio.
- n) Diagrama de resultados.
- o) Análisis estadístico (significancia)

- 3 ) Comparar el TL7H11 (OADC) con los distintos medios de enriquecimiento (suero de caballo, líquido de ascitis y agua de coco).
- 4 ) Tolerancia al aumento de la concentración de antibiótico.
- 5 ) Efecto aditivo de los enriquecimientos OADC + factores de enriquecimiento.
- 6 ) Valoración cuantitativa del número de colonias de muestras clínicas en TL7H11 y el medio de nueva formulación.

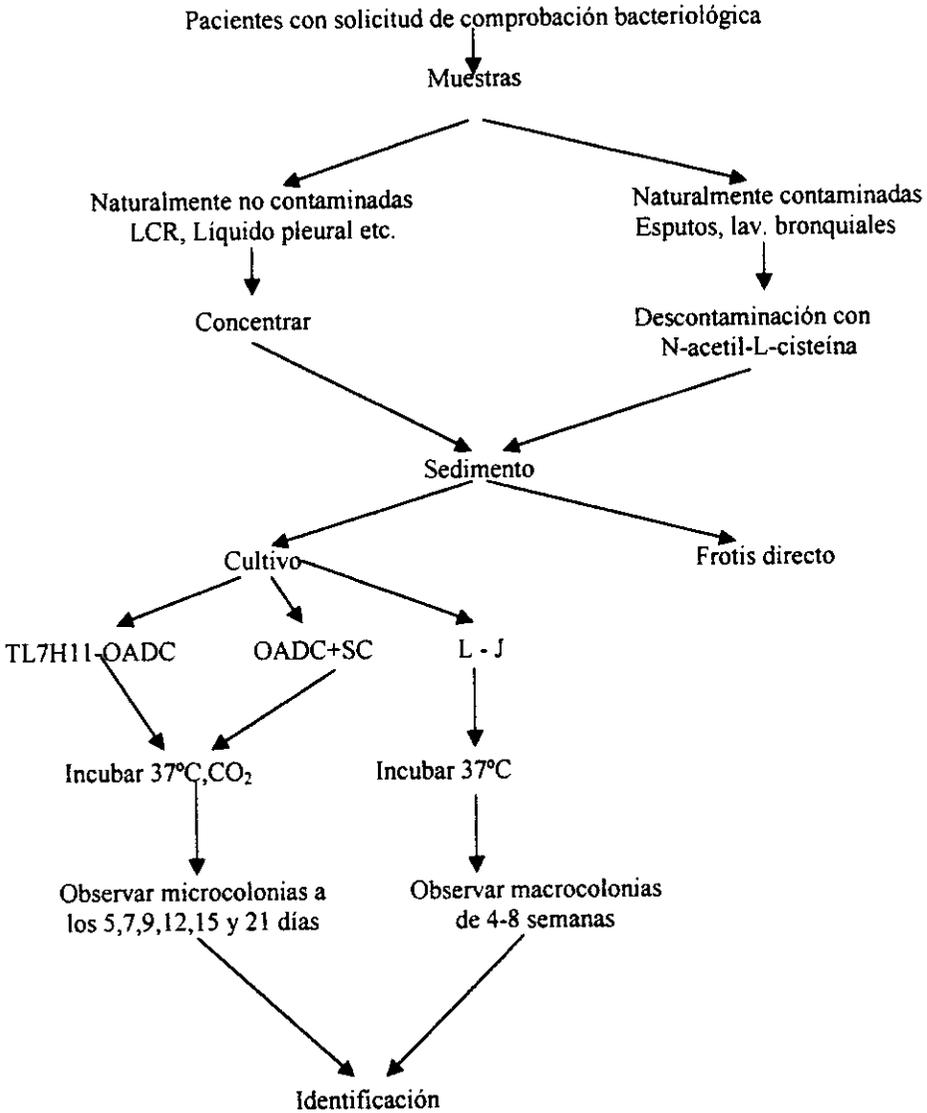
## DIAGRAMA DE FLUJO



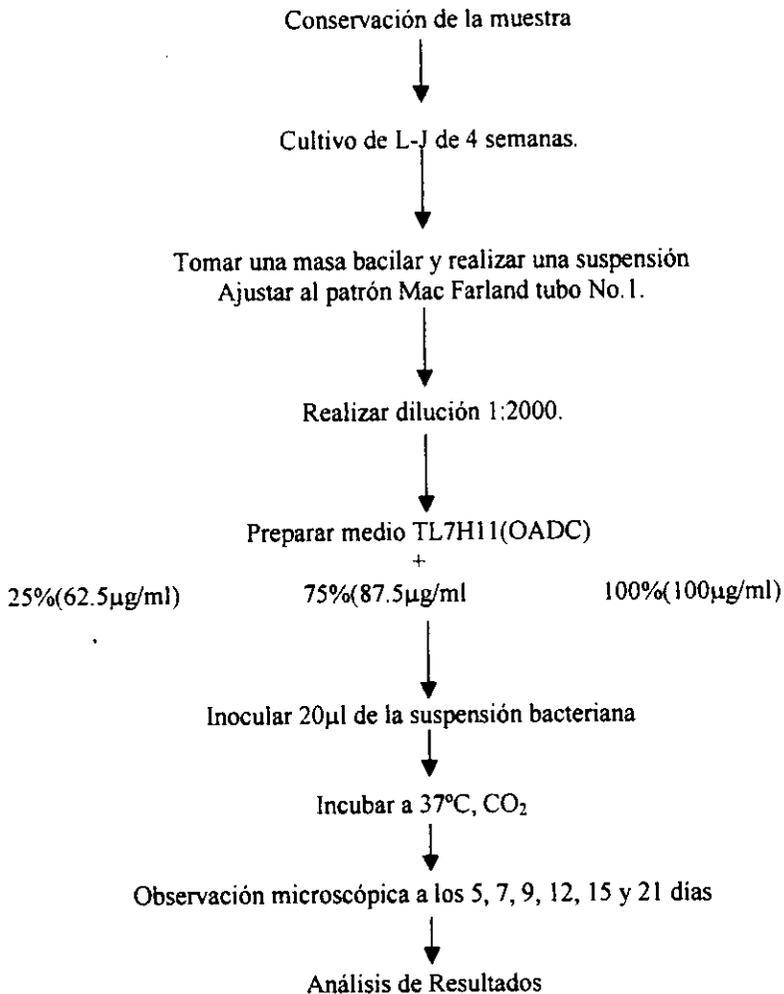
## Medio TL7H11 (OADC) más Factores de Enriquecimiento



# Valoración del Medio de Nueva Formulación con Muestras Clínicas



## Tolerancia al aumento de la concentración de Anfotericina B



## RESULTADOS

Se cuantificó el efecto de distintos enriquecimientos naturales: suero de caballo 10%, líquido de ascitis 10% y agua de coco al 20 y 40% en el medio de microcultivo de Capa Delgada.

Primero se determinaron condiciones óptimas del cultivo:

- a) Volumen del inóculo. Para el cual se trabajó con diferentes volúmenes (10 $\mu$ l - 100 $\mu$ l), por lo que el volumen más adecuado resultó ser el de 20 $\mu$ l, que después de distribuir en la superficie del medio con la varilla de vidrio en ángulo, y dejarlo absorber 10 minutos, no quedaba ninguna porción residual en la superficie del medio de la suspensión bacteriana
- b) Concentración. Se estandarizó utilizando una suspensión madre con una turbidez semejante al tubo No. 1 de Mac Farland que para *Mycobacterium tuberculosis* equivale a  $3 \times 10^7$  UFC/ml, con esta suspensión se realizaron dos diluciones 1:2000 y 1:5000, en las cuales se espero tener en 20 $\mu$ l en la primera dilución 300UFC y por la dilución 1:5000 120UFC/ml. De acuerdo a esta última dilución (1:5000), el No. de UFC en los medios con o sin aditivo de enriquecimiento no fue satisfactorio por lo que se descartó dicha dilución.
- c) Tiempo de desarrollo: Se determinó utilizando el tiempo mínimo en que las colonias fueron observadas por microscopía.

En el medio de cultivo con suero de caballo se observó un No. total de colonias mayor en comparación con el medio OADC (Promedio de No. de colonias en el medio SC: 35.2 y en OADC 33.4). En cambio el cultivo con líquido de ascitis se observó un No. total de colonias de 8.4 y aún menor en los medios que tuvieron agua de coco como enriquecimientos. El crecimiento en los cultivos con OADC y SC fue a partir de los nueve días, mientras que con el líquido de ascitis hasta los doce días, y 15 días para los cultivos con agua de coco. Estos datos fueron reproducibles en diez ensayos. Gráficas de Curvas de crecimiento 1- 10.

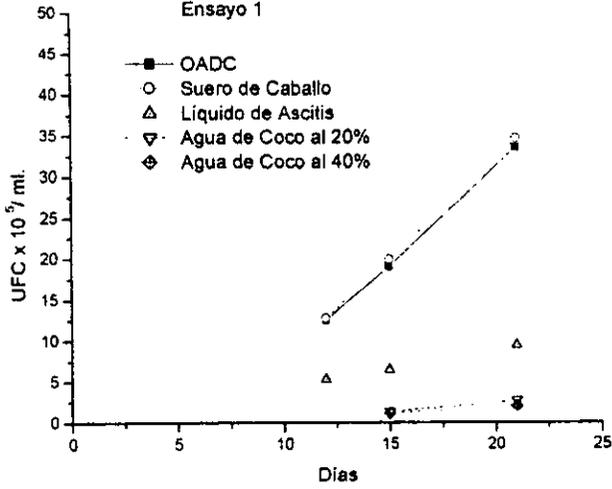
Cuando se adicionó al medio de cultivo TL7H11 (OADC) cada uno de estos aditivos de enriquecimiento, se presentó un mayor número de colonias (Promedio del No. total de colonias a los 21 días de incubación 35.8) en el medio OADC-SC, obteniéndose el desarrollo a partir de los 7 días, en comparación con el cultivo OADC solo (Promedio total de colonias 31.8). Mientras que en los cultivos OADC-líquido de ascitis y OADC-agua de coco que fue hasta los 9 días.

El No. total de colonias hasta los 21 días en estos dos últimos cultivos fue 23.4 para el OADC-líquido de ascitis, y en el OADC- agua de coco 20.4. Gráficas de curvas de crecimiento, comparación del TL7H11+ factores de enriquecimiento.

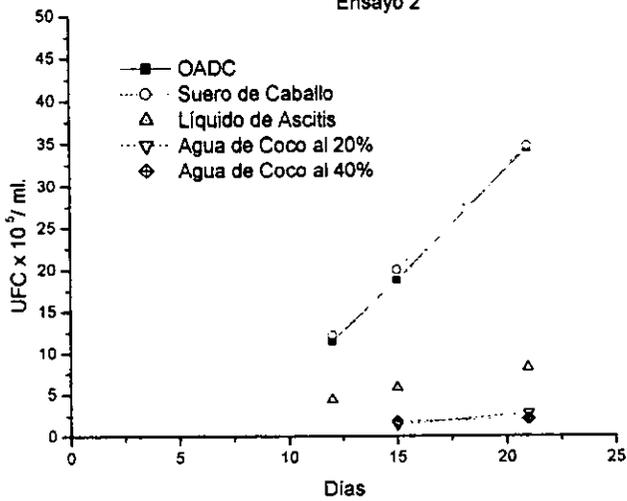
Posteriormente se estableció la tolerancia al aumento de la concentración de Anfotericina B en el medio de cultivo TL7H11-OADC. Por lo que se incrementó en un 25, 75 y 100% la concentración de este antibiótico sin disminución significativa en el No. de colonias en los 5 ensayos realizados.

Para evaluar el medio con suero de caballo en comparación con el estándar se utilizaron muestras clínicas. El aislamiento total (17/71) de acuerdo al tipo de muestra clínica fue del 24% de los cuales el 45% corresponden a expectoraciones. Los detalles de acuerdo a las demás muestras se encuentran en la Tabla 1.

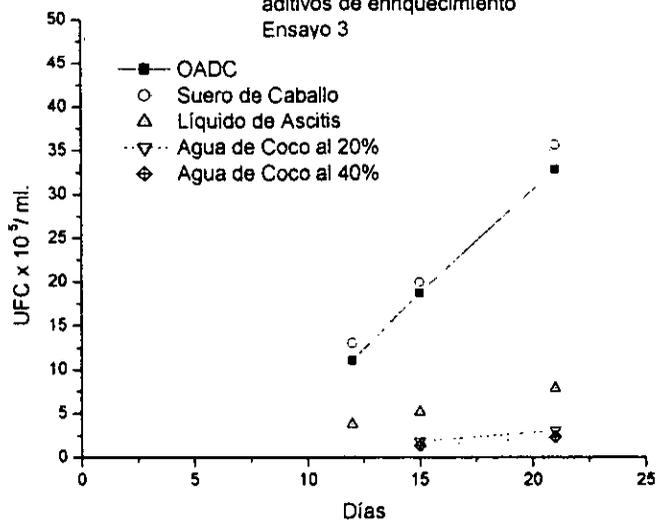
Curvas de crecimiento con distintos  
aditivos de enriquecimiento  
Ensayo 1



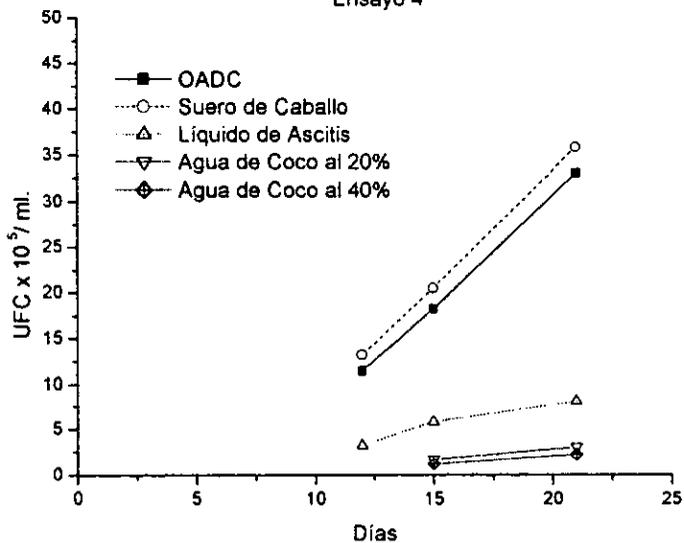
Ensayo 2



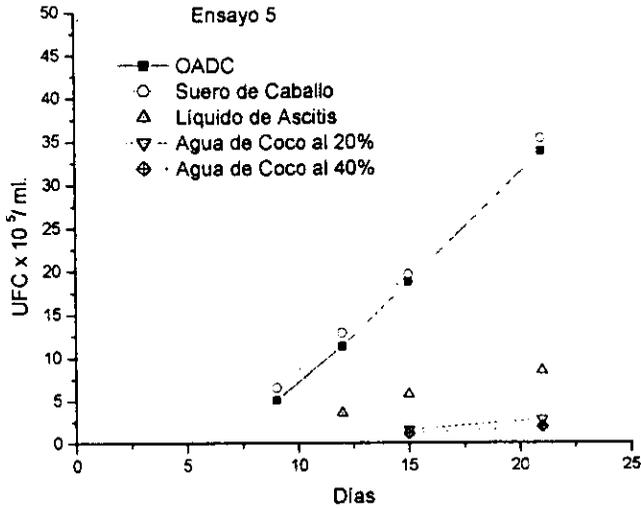
Curvas de crecimiento con distintos  
aditivos de enriquecimiento  
Ensayo 3



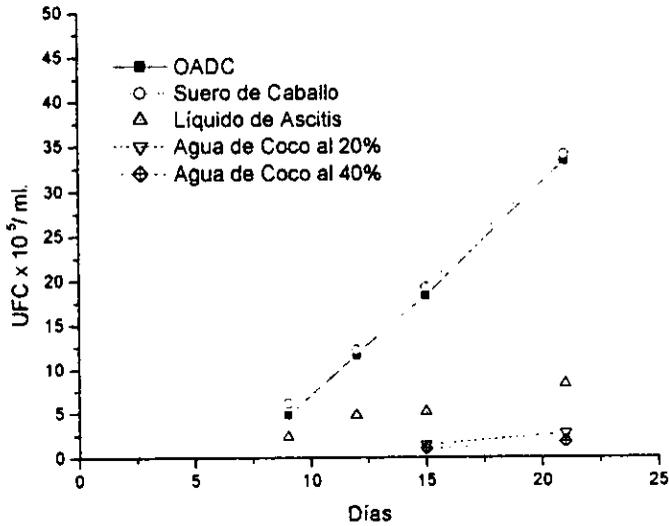
Ensayo 4



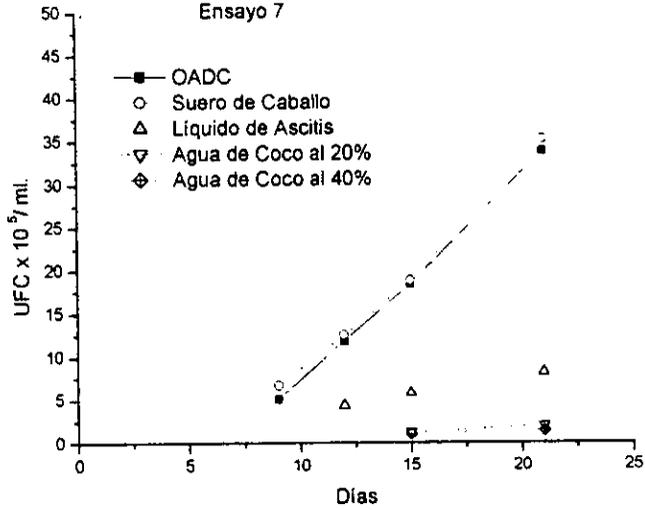
Curvas de crecimiento con distintos  
aditivos de enriquecimiento  
Ensayo 5



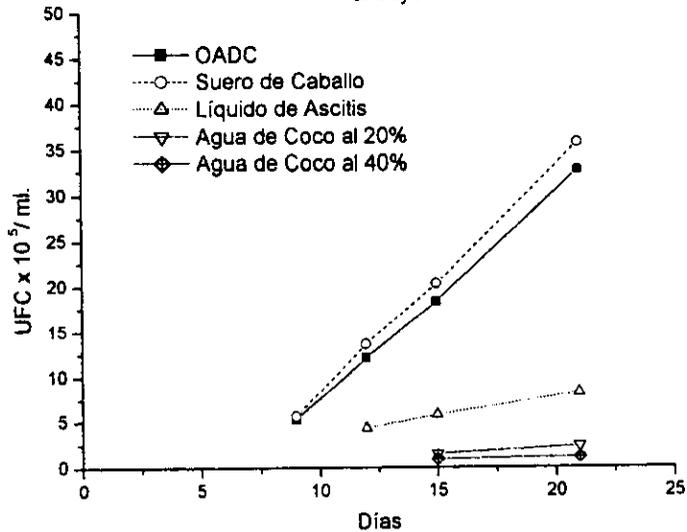
Ensayo 6



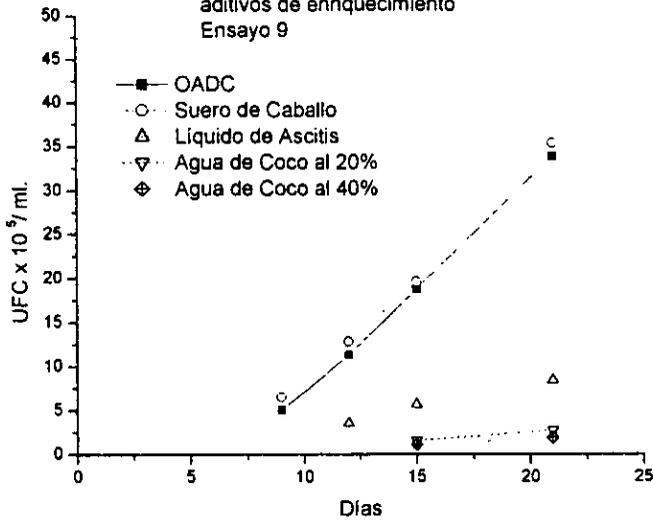
Curvas de crecimiento con distintos  
aditivos de enriquecimiento  
Ensayo 7



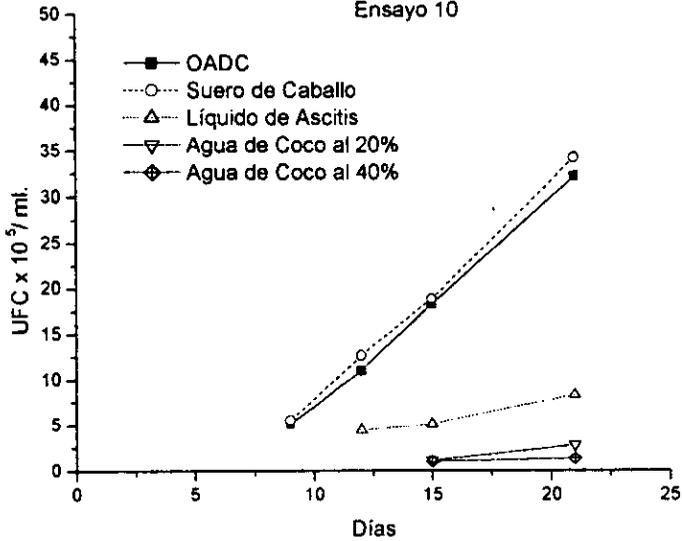
Ensayo 8



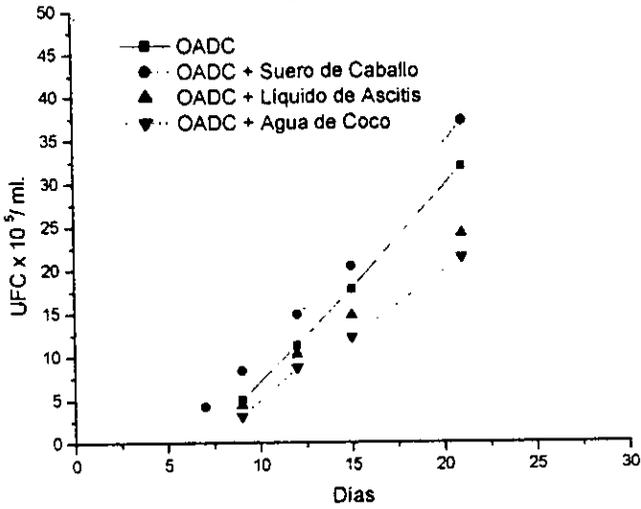
Curvas de crecimiento con distintos  
aditivos de enriquecimiento  
Ensayo 9



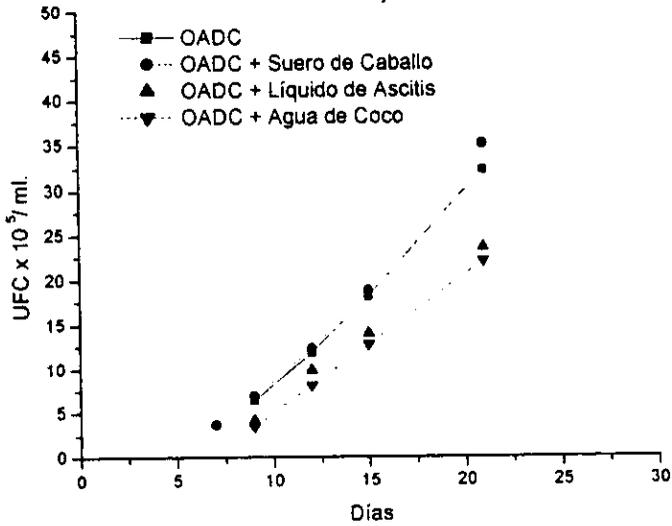
Ensayo 10



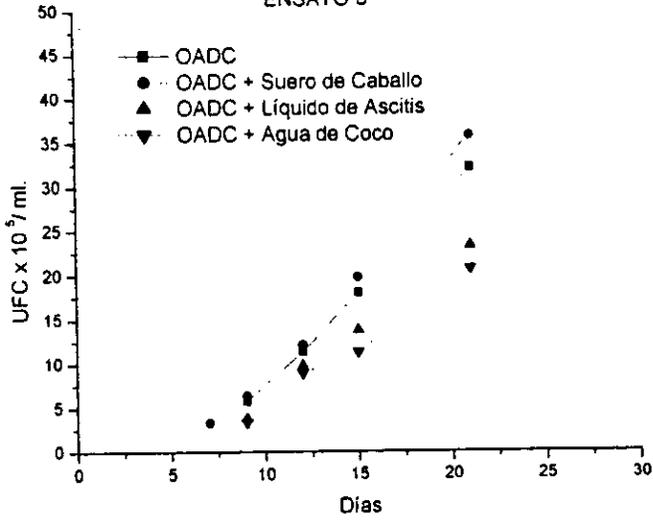
EFFECTO ADITIVO DE LOS ENRIQUECIMIENTOS  
ENSAYO 1



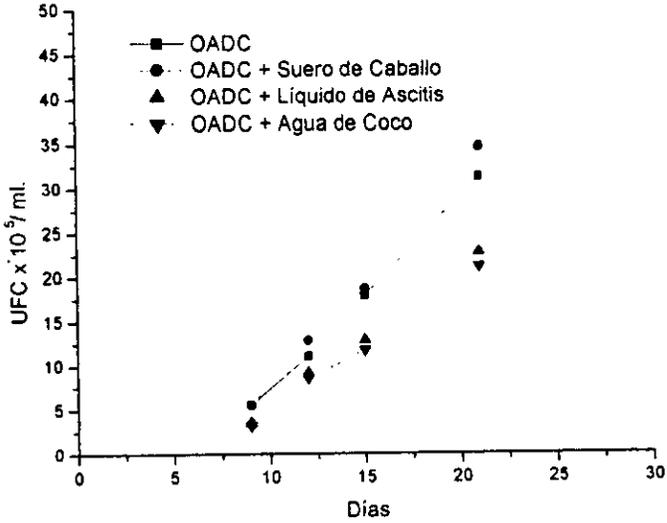
Ensayo 2



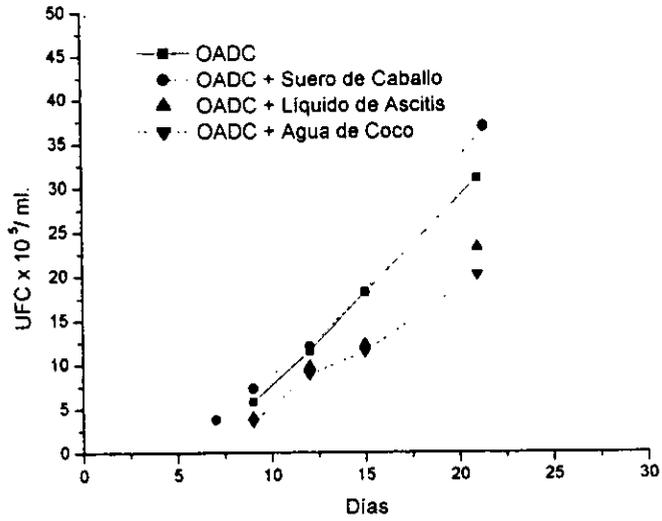
EFFECTO ADITIVO DE LOS ENRIQUECIMIENTOS  
 ENSAYO 3



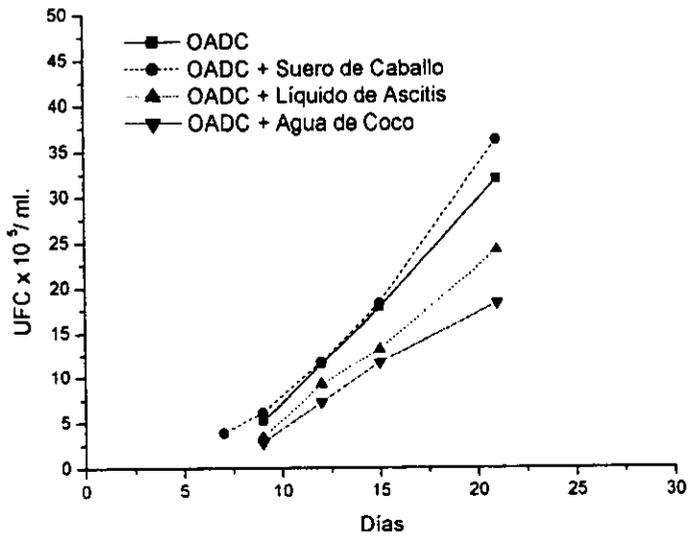
ENSAYO 4



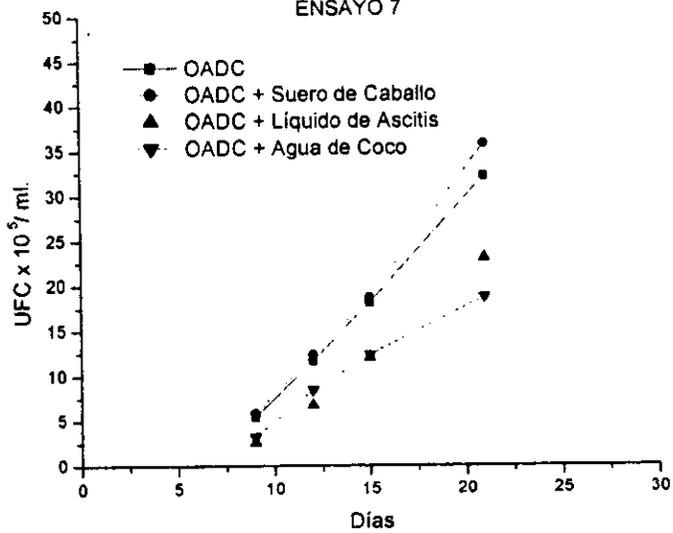
EFFECTO ADITIVO DE LOS ENRIQUECIMIENTOS  
ENSAYO 5



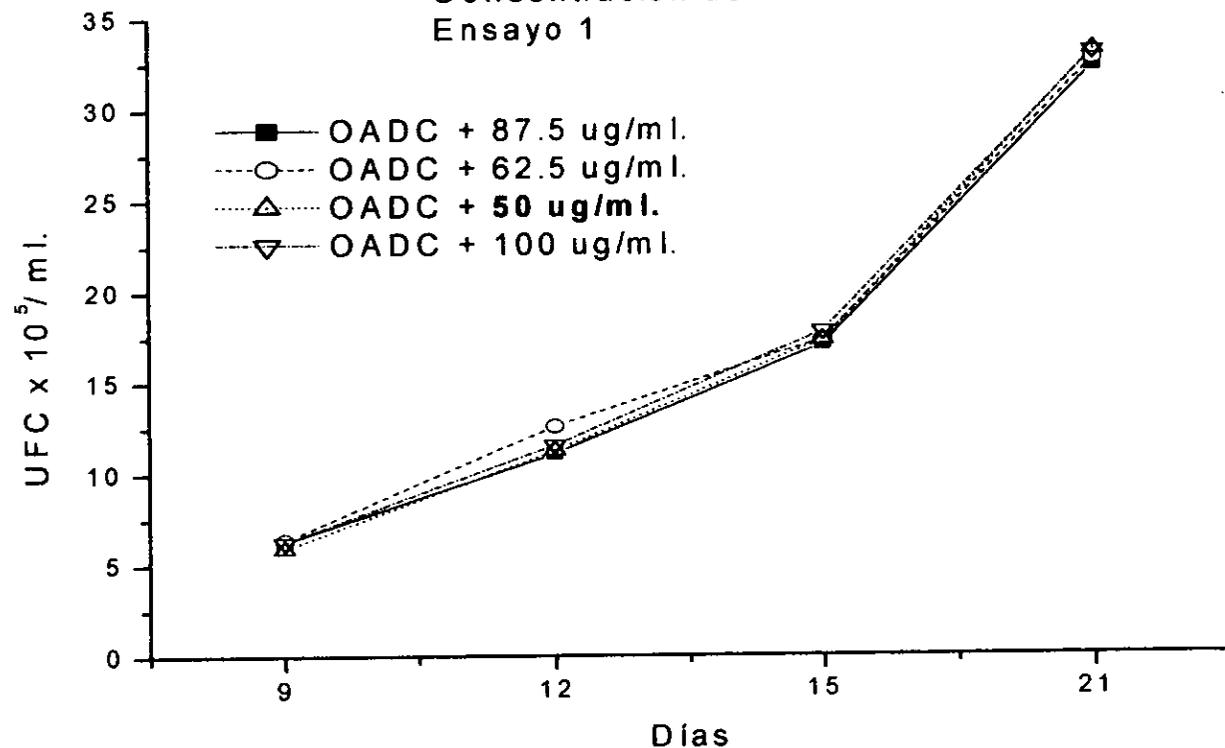
ENSAYO 6



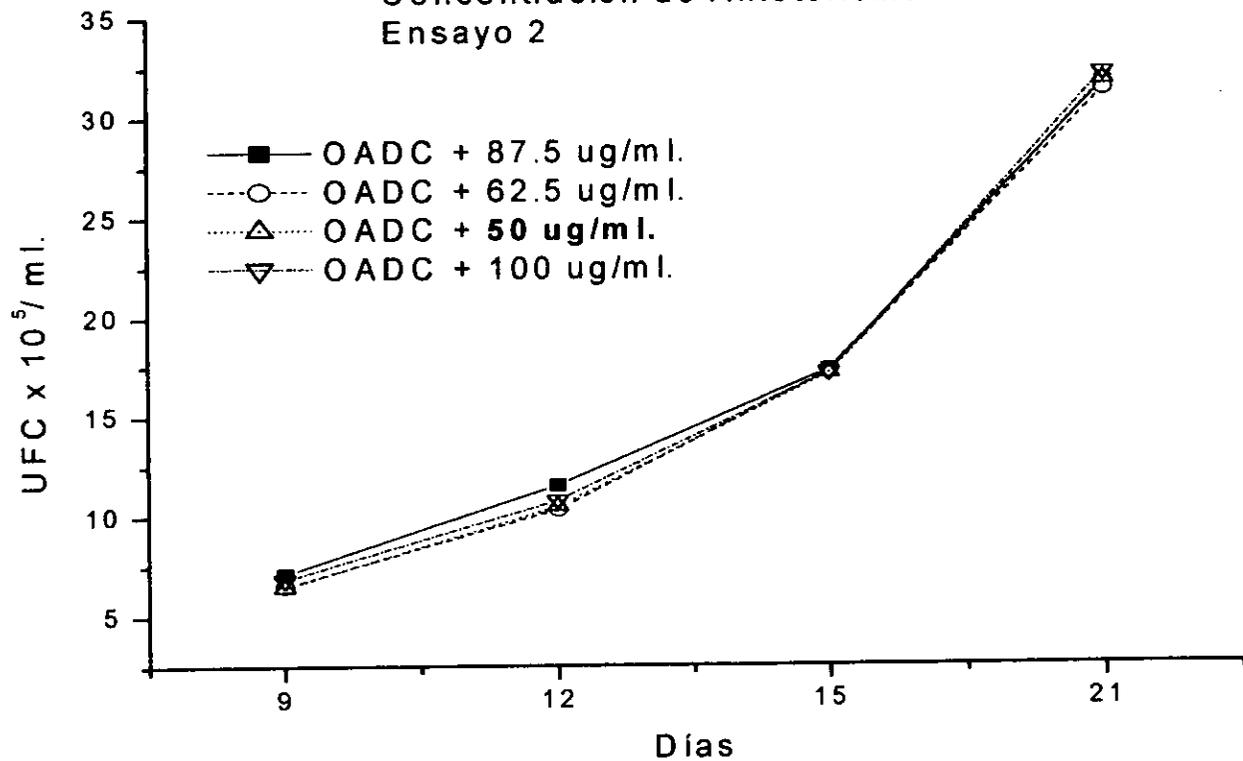
EFFECTO ADITIVO DE LOS ENRIQUECIMIENTOS  
ENSAYO 7



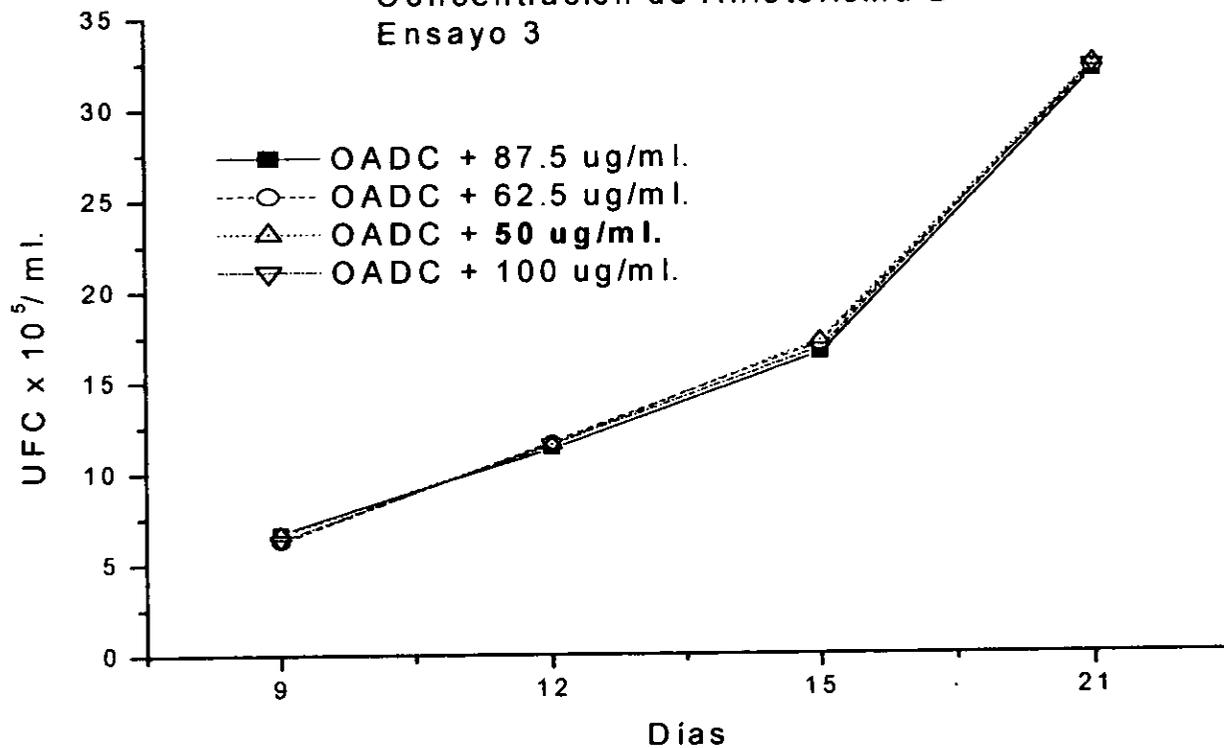
Tolerancia al Aumento de la  
Concentración de Anfotericina B.  
Ensayo 1



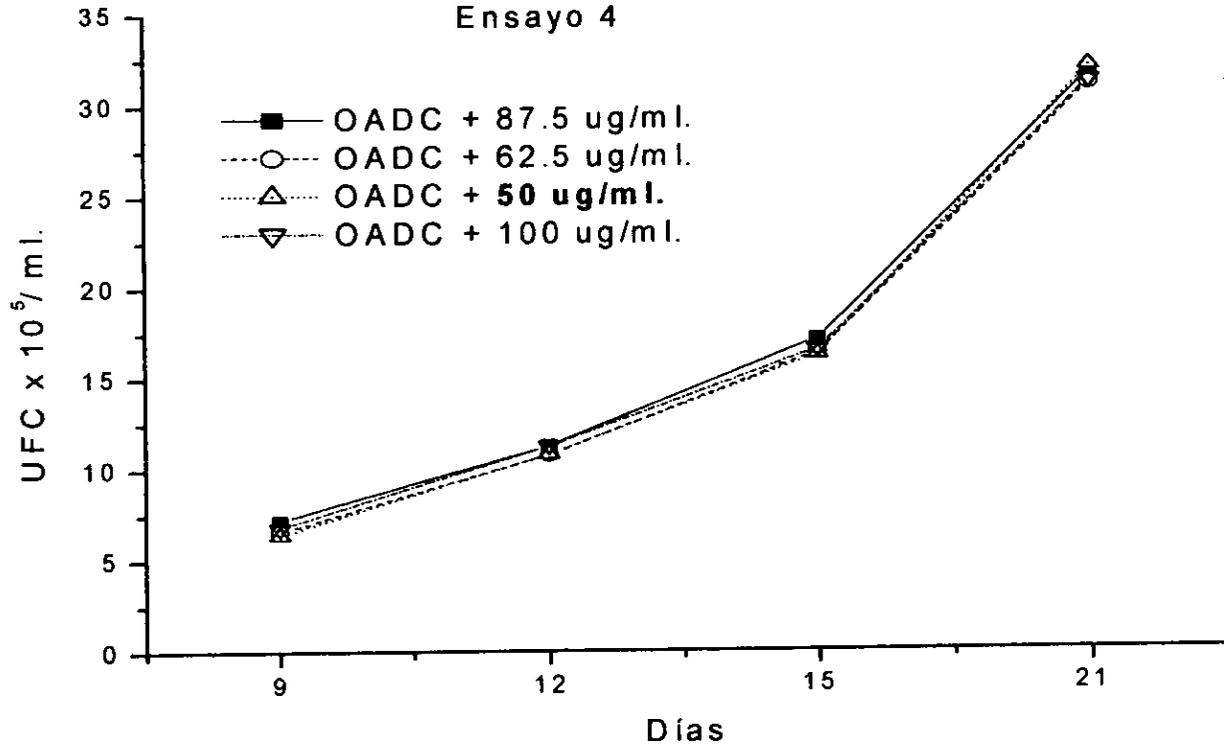
Tolerancia al Aumento de la  
Concentración de Anfotericina B.  
Ensayo 2



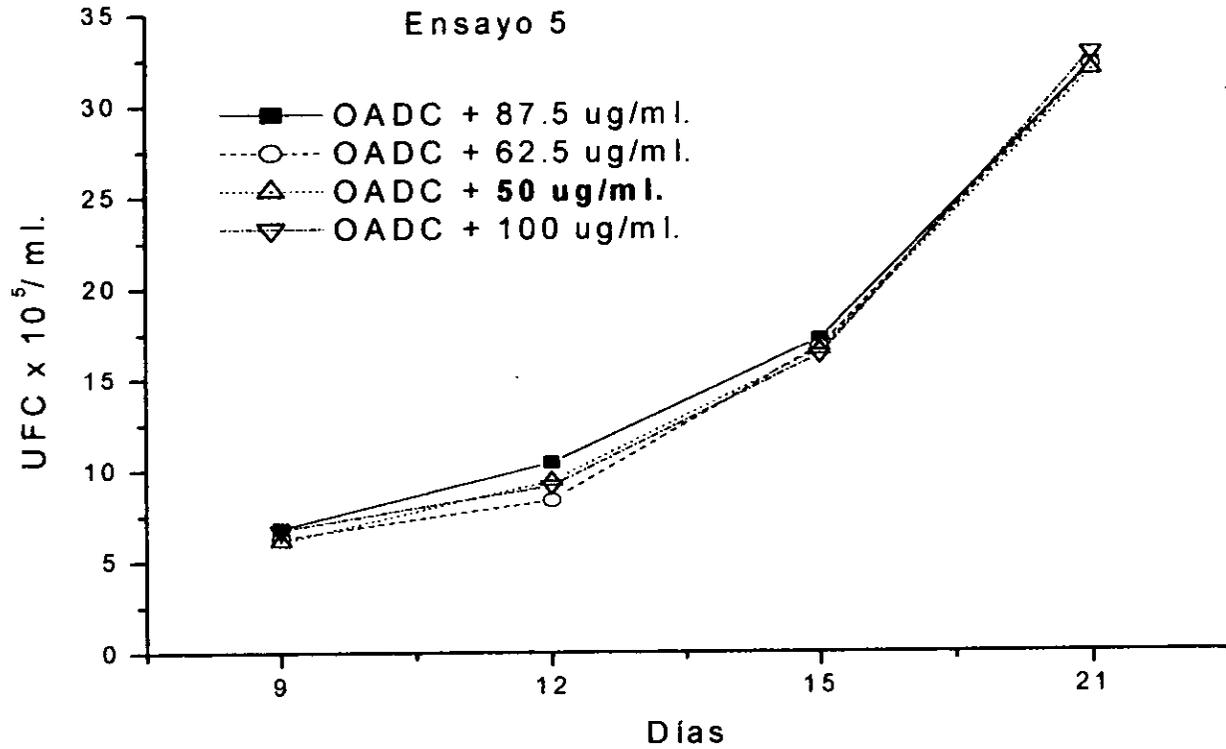
Tolerancia al Aumento de la  
Concentración de Anfotericina B  
Ensayo 3



Tolerancia al Aumento de la  
Concentración de Anfotericina B  
Ensayo 4



Tolerancia al Aumento de la  
Concentración de Anfotericina B  
Ensayo 5



**Tabla 1.** Total de positivos de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo al tipo de muestra.

Tipo de Muestras Clínicas	No. de Positivos / Total	% Positividad
Espustos	13 / 29	45 %
Lavados bronquiales	3 / 32	9.37 %
Líquidos pleurales	0 / 2	-
L. C. R	0 / 2	-
Lavados gástricos	0 / 1	-
Orinas	0 / 4	-
Piel	1 / 1	100 %
	$\Sigma=17 / 71$	24 %

En la *Tabla 2* se detallan los resultados en función del grado de positividad de la baciloscopia. En las dos muestras con baciloscopia negativa pero cultivo positivo en los tres medios (TL7H11.(OADC), OADC+SC y L-J), se observa que las dos muestras provienen de lavados bronquiales por lo que son muestras pobres en bacilos en comparación con las expectoraciones.

**Tabla 2.** Resultados en Función del Grado de Positividad de la Baciloscopia.

Resultado de la baciloscopia	No. total	No. de casos positivos en cultivos		
		TL7 H11	TL7H11+SC	L - J
Negativo	56	2 (3.6%)	2 (3.6 %)	2(3.6%)
+	9	9(100%)	9(100%)	9(100%)
++	0	0	0	0
+++	6	6(100%)	6(100%)	6(100%)

Con lo que respecta a la *Tabla 3* se observa el promedio de detección en días de acuerdo al tipo de muestra y medio de cultivo. El OADC+SC se tuvo un ahorro de tiempo (11 días) en comparación con el TL7H11-OADC (14 días) y el Löwenstein-Jensen (25 días).

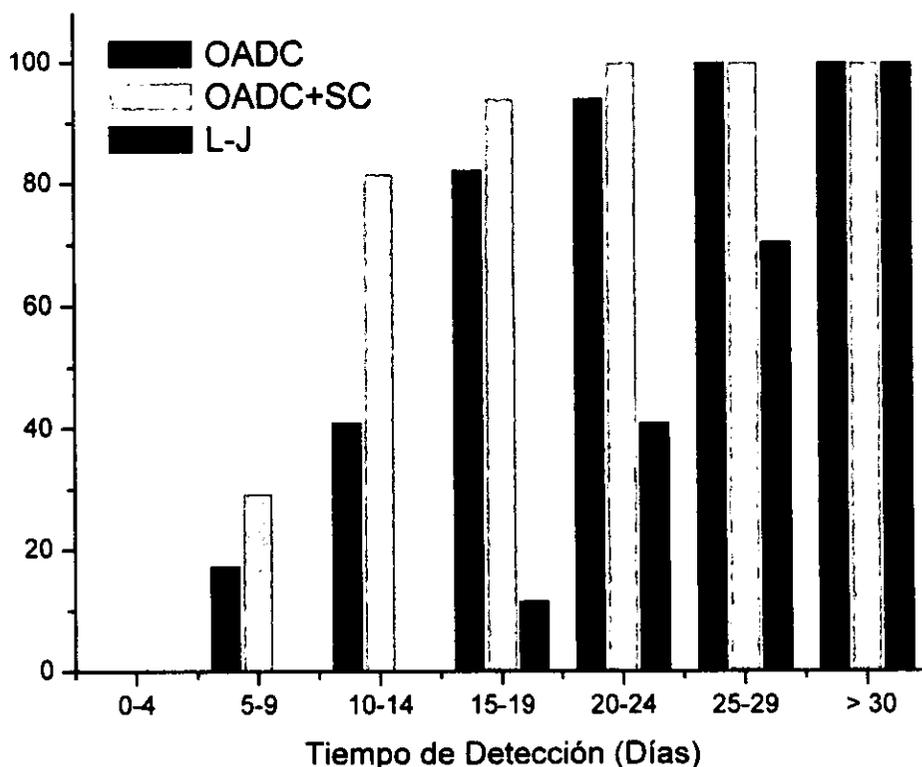
**Tabla 3.** Resultados del tiempo promedio de detección [días (rango)].

Muestra (No. total)	TL7H11	TL7H11+SC	L - J
Expectoraciones (12)	14d ( 7-21 )	11d ( 7-15 )	25d ( 16-34 )
Lavados bronquiales ( 4 )	10d ( 5-15 )	9d ( 7-12 )	27d ( 23- 32 )
Piel (1)	28d*	21d*	43d*
Otros (9)*	0	0	0

\* Única muestra resiembra a partir del cultivo 12B.

• Otros :Lavados gástricos, Líquidos pleurales, LCR y Orinas.

Porcentaje Acumulativo de Aislamientos Positivos de acuerdo al tiempo de crecimiento en TL7H11, TL7H11+SC y L-J.



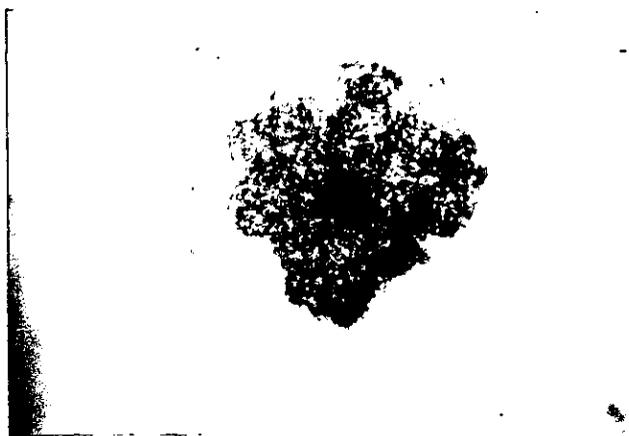


**Fotografía 3.** Microcolonia de *Mycobacterium tuberculosis* de 12 días en el medio TL7H11 (OADC)-SC -20X.



**Fotografía 4.** Microcolonia de *Mycobacterium tuberculosis* de 15 días en el medio TL7H11(OADC)-SC -20X

**Fotografía 5.** Microcolonia de *Mycobacterium tuberculosis* de 9 días en el medio TL7H11 (OADC) - 20X.



**Fotografía 6.** Microcolonia de *Mycobacterium tuberculosis* de 21 días en TL7H11(OADC) - 20X.

## APÉNDICE

### Técnica de Ziehl - Neelsen

#### a) Fucsina fenicada:

Fucsina básica	3 g
Alcohol etílico de 95°	100ml

Disolver por agitación en un matraz aforado, agregando lentamente el alcohol, y añadir 55 ml de fenol acuoso.

#### Fenol acuoso:

Fenol en cristales	100 g
Agua destilada	10 ml

Calentar en baño maría hasta la disolución completa del fenol y enfriar.  
Agitar y agregar agua destilada hasta completar 1 L.  
Dejar reposar 24 horas y filtrar.  
Filtrar una vez por semana.

#### b) Azul de Metileno

Azul de metileno	1 g
Alcohol etílico 95°	100ml

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

#### c) Solución decolorante (alcohol - ácido)

Ácido clorhídrico	30 ml
Alcohol etílico de 95°	970 ml

## PROCEDIMIENTO

- 1) Se filtra el colorante de carbolfucsina para minimizar la formación de cristales.
- 2) Cubrir toda la laminilla con el colorante filtrado. Calentar lentamente hasta que haya emisión de vapores por 5 minutos. Agregar más colorante si se seca la laminilla.
- 3) Dejar enfriar.
- 4) Eliminar el colorante y enjuagar brevemente con agua.
- 5) Decolorar con alcohol-ácido.
- 6) Enjuagar con agua.
- 7) Cubrir con azul de metileno y dejar reposar 1 minuto.
- 8) Enjuagar con agua.
- 9) Dejar secar el frote al aire.
- 10) Examinar con objetivo de inmersión (100x).

## MEDIO DE LÖWENSTEIN-JENSEN

La composición del medio es la siguiente:

Fosfato monopotásico anhidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2.40 g
Sulfato de Magnesio ( $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.24 g
Citrato de Magnesio	0.60 g
L - asparagina	3.60 g
Glicerina bidestilada	12 ml
Agua destilada	600 ml
Huevos enteros frescos	1000 ml
Verde de malaquita al 2 %	20 ml

Disolver las tres primeras sales y la asparagina en 200 ml de agua destilada. Es necesario calentar suavemente a baño maría para la disolución de la asparagina.

Filtrar en un matraz de 2000 ml. Adicionar la glicerina y el resto del agua destilada hasta completar 600 ml. Esterilizar en el autoclave durante 15 minutos a  $120^\circ\text{C}$ , dejar enfriar.

Colocar los huevos en una solución de NaOH al 2 %, durante 1 hora, después cepillar uno por uno, se enjuagan con agua, y se colocan en alcohol durante 30 minutos.

Todo material de vidrio a emplear debe estar escrupulosamente limpio y enjuagado antes de que sea esterilizado.

Quebrar los huevos uno a uno en un vaso estéril, observar que la yema este firme, colocarlas en un matraz que contiene pedacera de vidrio, agitar y filtrar con un embudo que tiene gasas estériles y éste a su vez en una probeta graduada. Medir la cantidad señalada anteriormente. Todo material debe ser estéril.

Vaciar los huevos homogeneizados en el matraz que contiene la solución con sales, asparagina y glicerina. Adicionar enseguida la solución acuosa del 2 % de verde de malaquita recién preparada y esterilizada. Mezclar bien agitando manualmente el matraz y dejar reposar unos minutos para que las burbujas de aire contenidas en el medio asciendan a la superficie y se eliminen.

UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE LA BIBLIOTECA

Para la filtración del medio se emplea un percolador con la parte superior cubierta con doble capa de gasa. Al extremo del percolador se coloca un tubo de látex y a éste un tubo de vidrio. Antes de envasar se coloca en el tubo de látex una pinza de Mohr. Vaciar el medio de cultivo para filtrarlo a través de la gasa.

Distribuir el medio en tubos, en condiciones de esterilidad, abriendo y cerrando la pinza de Mohr. La cantidad de medio en cada tubo debe ser suficiente para obtener, un plano inclinado. Para ello es conveniente tener un tubo patrón marcado al nivel correspondiente. Al distribuir, evitar la formación de burbujas dejando escurrir el medio de cultivo por la pared interna del tubo.

Colocar en el coagulador los tubos, éste debe tener una temperatura de 85°C. El tiempo de coagulación deberá contarse a partir del momento en que la temperatura interna del equipo alcance los 85°C. La coagulación debe hacerse durante un tiempo máximo de 50 minutos.

Terminando el tiempo de coagulación, retirar los tubos evitando su enfriamiento brusco. Una vez a temperatura ambiente llevarlos a la cámara de cultivos a 37°C, dejándolos durante 48 horas para controlar su esterilidad y eliminar el agua de condensación, los tapones deben quedar ligeramente flojos. Se guardan los tubos en refrigeración ajustando bien los tapones para evitar la desecación.

## MEDIO DE CULTIVO MIDDLEBROOK TL7H11

### MIDDLEBROOK 7H11 MODIFICADO (capa delgada)

- Middlebrook 7H10 agar	18 gr
- Hidrolizado de caseína	1 gr
- Glicerol	5 ml
- Agua destilada	900 ml

#### Preparación de antibióticos soluciones stock

- Cefotaxidima: Adicionar 500 mg de Cefotaxidima a 10 ml de regulador de fosfatos (pH 7), y guardar en alicuotas de 1 ml, adicionar 500  $\mu$  l / 500 ml de medio.

- Anfotericina B: Realizar una solución de 200 mg del antibiótico en 10 ml de agua destilada y guardar en alicuotas de 1 ml. Adicionar 500  $\mu$  l a 500 ml de medio.

- Lactato de Trimetoprim: Realizar una solución de 200 mg del antibiótico en 10 ml de HCl 0.05 molar (calentar un poco antes de adicionar el agua al HCL). Guardar en alicuotas de 1 ml. Adicionar 500  $\mu$  l a cada 500 ml de medio.

" Se cambió en antibiótico original Piperacilina por Cefotaxidima. "  
Guardar todas las soluciones de antibiótico a -70°C.

Esterilizar en autoclave a 121°C por 10 minutos. Enfriar a una temperatura aproximadamente de 50°C la base del medio. Adicionar 100 ml del enriquecimiento OADC y los antibióticos. Vaciar en cajas.

## Reactivo para Digestión y Descontaminación de las Muestras

Hidróxido de Sodio 4%	50 ml
Citrato trisódico . 3H <sub>2</sub> O 0.1 M (2.94%)	50 ml
N-acetil- L-cisteína	0.5 g

### Buffer de Fosfatos M/15 p H: 6.8

#### Solución A

Fosfato disódico M/15	9.47 g
Agua destilada	1000 ml

#### Solución B

Fosfato monopotásico M/15	9.07 g
Agua destilada	1000 ml

Preparar cada una de las soluciones por separado. Mezclar 625 ml de la solución B a 375 ml de la solución A y ajustar el p H a 6.8. Esterilizar.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Secretaria de Salud. Manual de procedimientos. Programa de prevención y control de la tuberculosis. México 1999. p. 1-22.
- 2.- Balandrano S, Anzaldo G. Manual de Procedimientos de Laboratorio. INDRE/SAGAR. Secretaria de Salud, 1996:p 4-10, 42-69.
- 3.-OMS. Laboratory Services in Tuberculosis Control Culture Partel11.Geneva , Switzerland, 1998: 9-11, 37-57.
- 4.- Rom W.N, Stuart MM.G. Tuberculosis. 5 ed. Ed Little Brown and Company. Nueva York, 1996. p. 160-175,230-255.
- 5.- Herzog B. History of tuberculosis. Respiration, 1998.65: 5-15
- 6.-Harrison. Principios de medicina interna. Ed Mc Graw Hill Interamericana. México 1998. p.1149-1161
- 7.- Collard P. El desarrollo de la microbiología. 1 ed. Ed Reverté. México 1995. p. 23-32.
- 8.-Stanier R. Microbiología. 2 ed. Ed Reverté. México 1996. p. 11-15.
- 9.- Dulbeco D. Tratado de Microbiología. 2 ed. Ed Salvat. Barcelona España 1983. p.6, 104-106.
- 10.- Secretaria de Salud. Medios de Cultivo. Validación. México 1990. p.3-8.
- 11.- Norma Oficial Mexicana NOM 006- SSA2- 2000.
- 12.- Fox J,L. Perspectives on Pathogens at ASM Centennial Symposium. ASM. News 2000. 66 (1): 11-14.
- 13.- Red Latinoamericana y del Caribe de Tuberculosis. Nuevas tecnologías para el diagnóstico y pruebas de susceptibilidad a drogas de *Mycobacterium tuberculosis* para países en vías de desarrollo. INLASA. La Paz Bolivia, 1998: 20-32.
- 14.- Herrera T, Torres M. Nuevos métodos en el diagnóstico de la tuberculosis. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 1993. 13 (1): 15 - 19.
- 15.- Murray P.R. Manual of clinical microbiology. 7 ed. Ed ASM Press Washington (DC), 1999. p. 399-420.

- 16.- Vasanthakumari.R, Jagannath K. Rapid culture of tubercle bacilli. World Bolletin Organization OMS.1998, 76 (3): 309-311.
- 17.-Koneman W.E. Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5 ed. Philadelphia:Lippincott, 1997. p. 894 - 909.
- 18.- Rhoner P. Ninet B, Meral C. Evaluation of the MB/Bact System and Comparison to the Bactec 460 System and Solid media for isolation of Mycobacteria from clinical specimens. J. Clin Microbiol., 1997, 35 (12): 3127- 3133.
- 19.- Roggenkamp A, Hornef M. Comparison of MB/Bact and Bactec 460 TB Systems for recovery of Mycobacteria in a routine diagnostic laboratory. J.Clin Microbiol, 1999, Nov 37(11): 3711-3712.
- 20.- Stager C.E, Libonati J.P. Role of solid Media when used in conjunction with the Bactec system for Mycobacteria isolation and identification. J. Clin. Microbiol. 1998, Enero 29 (1): 154-157.
- 21.- Somoskovi A, Magyar P. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator tube with MB Redox, Löwenstein- Jensen, and Middlebrock 7H11 Media for recovery of Mycobacteria in clinical specimens. J.Clin.Microbiol, 1999, Mayo 37(5): 1366-1369.
- 22.- Brunello F. Favari F. Comparison of the MB/Bact and Bactec 460 TB Systems for recovery of Mycobacteria from various clinical specimens. J. Clin. Microbiol, 1999, Abril 37(4): 1206-1209.
- 23.-Welch D.F. Guruswamy A. Timely culture for Mycobacteria which utilizes a microcolony method. J. Clin.Microbiol, 1993, Agosto 31(8): 2178-2184.
- 24.- Runyon E.H. Identification of micobacterial pathogens utilizang colony characteristics. Am .J. of Clin Pathol 1970, 54: 578-585.
- 25.- Mejía G.I, Castrillon, L., Robledo, J.A y Trujillo, H. Microcolony detection in 7H11. Thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. Int J. Tuberc Lung Dis 1999, 3 (2):138-142.
- 26.- Woods. G, Fish G. Clinical evaluation of Difco Esp culture system 11 for growth and detection of Mycobacteria. J.Clin.Microbiol. 1997, Enero 35(1):121-124.
- 27.-San Luis O. El retorno de la peste blanca. Salud Epidemiología, 1994, Diciembre 25: 44-51.
- 28.-Ratledge.C, Dale. J. Mycobacteria Molecular Biology and Virulence. 5 ed. Ed Blackwell Science. USA, 1999 p.2-3.

- 29.- Viader S.J, Guerrero O.M. Nuevas alternativas en el diagnóstico de la tuberculosis. Ciencia UANL 1998, Abril-Junio 1(2):119-125.
- 30.- McCarter Y.S, Ratkiewicz. Cord formation in Bactec medium is a reliable, rapid method for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. J.Clin. Microbiol 1998, Septiembre 36(9): 2769-2771.
- 31.-Butler W.R, Warren N.G. Modified method for testing the quality of albumin-contaming enrichments used in growth media for Mycobacteria. J.Clin Microbiol 1990, Mayo 28(5): 1068-1070.
- 32.- Calderón J.E. Aplicación clínica de antibióticos y quimioterapicos. 7 ed. Ed Méndez. México 1997. p.170-175.
- 33.- Kjeldsberg C.R. Body Fluids. 2 ed. Ed American Society Of Clinical Pathologists Press. Chicago 1986. p.75-98.
- 34.- Ramírez C.E. Lo esencial en diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis. Facultad de Medicina UNAM, 1998, 5(10): 106-119.
- 35.-Marcial L.D. Etiología de la Tuberculosis. Salud Publica de México. 1982, 24(3): 241-249.
- 36.- Pfyffer G.E, Welscher H.M. Comparison of the Mycobacteria growth indicator tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast-bacilli. J. Clin. Microbiol 1997. Febrero 35(2). p. 364-368.
- 37.- Pumarola A. Microbiología y Parasitología Médica. 2 ed. Ed Ediciones Científicas y Técnicas Salvat. Barcelona España 1994. p: 510-520.
- 38.- Pfyffer G.E, Cieslak C. Rapid detection of Mycobacteria in clinical specimens by using the automated Bactec 9000 MB system ans comparison with radiometric and solid culture system. J. Clin Microbiol, 1997, 35(9): 2229-2230.