



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

31

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

“PROMOCIÓN DEL DESARROLLO DE *Mycobacterium tuberculosis* EN LOTES DE MEDIO LOWENSTEIN-JENSEN DE DISTINTO ORIGEN”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

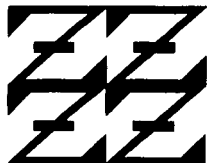
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

**MARIA ENGRACIA JIMENEZ REYES**

UNAM  
FES

ZARAGOZA



LO HUMANO EJE  
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. NELIDA RUTH PARRA MALDONADO  
ASESOR DE TESIS: Q. F. B. JOSE OSCAR GONZALEZ MORENO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE 2002



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 en Enfermedades Infecciosas y  
Parasitarias (UIMEP) del Hospital de  
Pediatria en el Centro Médico Nacional  
SSA XXV.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

México Libre de  
Tuberculosis

La Gratitud es la forma de expresar todo el bien recibido, la enseñanza de quien tiene experiencia y la formación que hace poner en práctica nuestras aptitudes.

Con esta palabra me dirijo y dedico este trabajo a:

Quien me dio la oportunidad de existir por mis Padres:

Mi mamá Georgina Reyes Negrete por todo el apoyo, desvelo, preocupación, ánimo y Amor que puso en mi para cumplir una de mis metas.

Mi papá Carlos G. Jiménez Melo por su paciencia, apoyo y esfuerzo.

Mis hermanas Geo, Clar y Yaz que fueron partícipes en tareas, ayuda en todo sentido y palabras de ánimo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Carlos, por los momentos compartidos, por su complicidad hasta en las tareas, por todo.

También quiero agradecer a:

M. en C. Ruth Parra Maldonado por la oportunidad de permitirme aprender de ella, compartir su experiencia y el apoyo que siempre me brindó.

El Dr. Javier Torres y al personal de la  
USMESP.

La Q.B.P. Ma. Teresa Álvarez y Muñoz por su interés y amistad.

La Dra. Adelina y a la Química Rosa María Palomino por su ánimo y apoyo.

El Q.F.B. José Oscar González Moreno por su asesoría y consejos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Mis amigas que estudiaron presentes en mi formación:  
Cointia, que compartió y "soportó" toda la experiencia de la tesis, Lety, Norma, Mari, Rocío, Mary.

# ÍNDICE

✘ Resumen	1
✘ Marco Teórico	2
✘ Definición. ¿Tuberculosis?, ¿Quién se llama así?	2
✘ ¿Cómo se transmite la infección?	2
✘ Patogenia	4
✘ Epidemiología	6
✘ Agente Causal. ¿Durmiendo con el enemigo?	8
✘ La Enfermedad. ¿Cómo se manifiesta?	9
✘ Tratamiento	10
✘ Composición química de la bacteria	11
✘ Diagnóstico	12
✘ Cultivo	14
✘ Control de Calidad	19
✘ Planteamiento del Problema	21
✘ Objetivo General y Objetivos Particulares	22
✘ Hipótesis	23
✘ Tipo de estudio, Criterios y Variables	24
✘ Diagrama de flujo	25
✘ Material y Métodos	26
✘ Material, Reactivos y Equipo	26
✘ Métodos: Estandarización de la Suspensión	27
✘ Promoción del desarrollo	27
✘ Evaluación de la dispersión	28
✘ Determinación de las Características Físicas del medio L-J	29
✘ Preparación del medio de cultivo L-J	31

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

✘ Diseño Estadístico	32
✘ Resultados	33
✘ Estandarización de la Suspensión	33
✘ Diluciones Seriadas	34
✘ Características Físicas	35
✘ Relación del Número de Colonias	44
✘ Efecto de Conservación	45
✘ Discusión	46
✘ Estandarización de la Suspensión	46
✘ Diluciones Seriadas	48
✘ Características Físicas	49
✘ Relación del Número de Colonias	54
✘ Efecto de Conservación	55
✘ Conclusiones	57
✘ Recomendaciones	58
✘ Anexos	59
✘ Anexo 1	60
✘ Anexo 2	62
✘ Anexo 3	63
✘ Anexo 4	65
✘ Referencias Bibliográficas	67

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

El diagnóstico confiable de la Tuberculosis (TB) es un paso importante y necesario para el control y prevención de dicha enfermedad, el cual está basado en la demostración de BAAR en frotis y específicamente el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en medios de cultivo sólido o líquido.

El cultivo en medio sólido como el Löwenstein-Jensen (L-J), es el estándar de oro para el diagnóstico de TB, por tal razón, la importancia de demostrar su Calidad en lotes de diferentes procedencias por medio de la promoción del desarrollo de la cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294.

La forma de conocer dicha cualidad de los 4 diferentes medios es el empleo de la observación para determinar las características físicas de cada medio (pH, burbujas, color, contaminación, volumen del medio), y la promoción del desarrollo del microorganismo mediante diluciones seriadas para establecer la relación del número de colonias para cada uno de los lotes (recién preparados) en los 13 ensayos mensuales. Para tal fin se empleo para la preparación del inóculo la metodología de Cannetti y la nefelometría de McFarland para estandarizarlo. Así también, a la par de dichos ensayos se determinó el efecto de la conservación de un lote de medio L-J de una de las casas comerciales.

En general, de acuerdo al número de colonias esperado las cuentas fueron bajas, con una diferencia no significativa entre cada uno de los lotes, pero al analizar el total de ensayos A= 6/13, B= 4/13, C= 4/13 y D= 2/13 se observa que existen diferencias entre los lotes de los diferentes proveedores. Así, La preparación del inóculo a partir de la suspensión madre, de acuerdo a la metodología de Cannetti, estandarizado por nefelometría permitió obtener una suspensión homogénea, sin embargo se requiere de práctica para disminuir el tamaño de partícula (congregado bacilar).

Las características físicas del medio L-J, así como los procesos que las establecen, son factores determinantes que afectan la cuenta viable, mientras que la conservación de un medio L-J en refrigeración (4 a 8°C) por un periodo de un año, disminuye la capacidad de aislamiento, lo cual se refleja en los 12 ensayos realizados, donde 5/12 de lotes del mes tienen una recuperación satisfactoria, mientras que del medio refrigerado únicamente 1/12 recupera favorablemente.



# MARCO TEÓRICO

## ¿TUBERCULOSIS? ¿Quién se llama así?.DEFINICIÓN

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa, generalmente crónica, causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*), que se transmite del enfermo al sujeto sano principalmente por contacto con personas enfermas bacilíferas, inhalación de material infectante, ingestión de leche de vaca infectada por dicho complejo o animales bovinos enfermos.<sup>1</sup>

## ¿CÓMO SE TRANSMITE LA INFECCIÓN?

La transmisión se produce por gotitas de saliva suspendidas en el aire provenientes de una persona con TB pulmonar o laringea que tose, estornuda, habla o canta<sup>2,3,4</sup>. La tos produce pequeñas gotitas infecciosas (núcleo de las gotas desecadas), en una cantidad de alrededor de 3000 por cada tos. Comúnmente la transmisión se produce bajo techo, que es donde se mantienen los núcleos de las gotas en el aire por largo tiempo.

La ventilación elimina los núcleos y la luz solar directa mata rápidamente los bacilos tuberculosos, pero éstos pueden sobrevivir varias horas en la oscuridad.<sup>2</sup>

El riesgo de exposición de un individuo depende de la concentración de núcleos en el aire contaminado y el tiempo durante el cual se respira dicho aire.<sup>2</sup>

Esta enfermedad se presenta en diferentes formas, pero la pulmonar es la de mayor importancia por su transmisión, un caso no tratado puede infectar de 10 a 15 personas<sup>5</sup>.

# El bacilo de la tuberculosis se propaga fácilmente



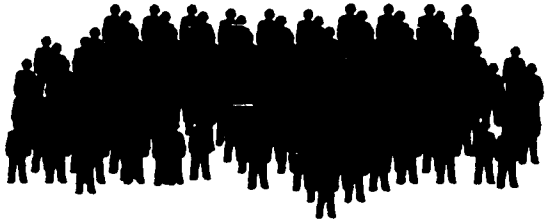
En un bar de Minneapolis, una persona tal vez haya infectado a 41



En un avión, una persona tal vez haya infectado a otras cuatro



En un astillero estadounidense, un obrero tal vez haya infectado a más de 400 personas



En término medio, una persona contagiosa infecta a unas 10 a 15 personas al año



Fuentes: *The New England Journal of Medicine*, 27 de julio de 1995; Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los EE. UU., marzo de 1995; Informe inédito de Mitsu B., Conshelmer K., Hogden G. et al. "TB outbreak in a shipyard"; estimaciones del Programa Mundial contra la Tuberculosis, de la OMS.

Figura 1. Transmisión de TB<sup>9</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## PATOGENIA

El microorganismo que ocasiona dicha enfermedad también es conocido con el nombre de bacilo tuberculoso, porque causa lesiones llamadas tubérculos.

La TB se presenta en dos etapas:

- a) una, conocida como tuberculosis primaria que aparece en individuos sin inmunidad específica y puede evolucionar a curación espontánea o conducir a la muerte, y
- b) la tuberculosis posprimaria, conocida también como reinfección, es crónica a pesar de la presencia de inmunidad específica del infectado.<sup>3</sup>

Los bacilos al ser inhalados por una persona, son depositados sobre la superficie alveolar (en el tercio inferior de los pulmones), donde el bacilo, si encuentra condiciones favorables de pH y aireación, comenzará a multiplicarse. Esta infección dará lugar en el sujeto receptor a dos mecanismos: la hipersensibilidad y la inmunidad.

Si la resistencia del hospedero es baja y el número de bacterias que ingresan es elevado, la infección progresa y puede extenderse por la circulación menor a ambos pulmones produciendo TB pulmonar miliar; pero si se disemina por la circulación mayor produce metástasis en ganglios, huesos, riñones, meninges, bazo, hígado o en forma sistémica a todo el organismo.<sup>3,7</sup>

El período de incubación es desde el momento de la infección hasta que se comprueba la lesión primaria o una reacción tuberculínica significativa, que es aproximadamente de 2 a 10 semanas, tiempo en que se desarrolla la inmunidad específica; el riesgo ulterior de TB pulmonar o extrapulmonar es máximo durante el primer o segundo año después de la infección, sin embargo puede persistir durante toda la vida en forma de infección latente.<sup>4</sup>

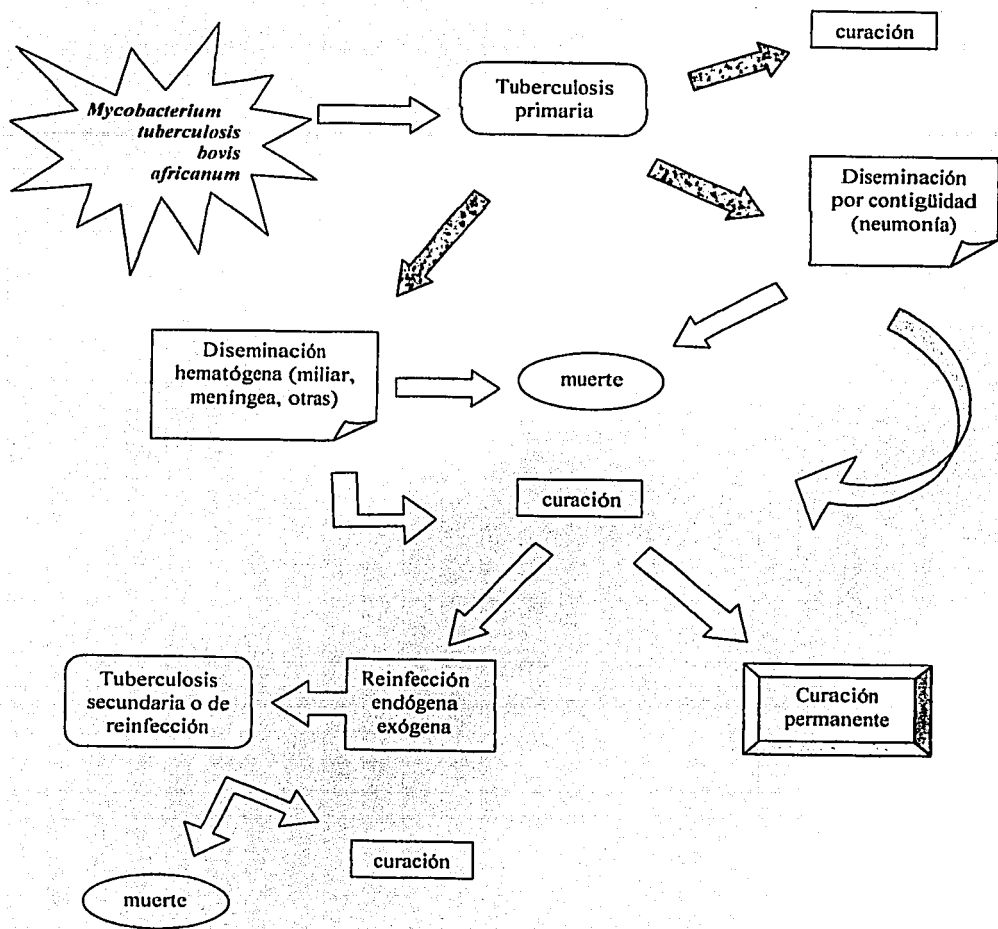


FIGURA 2. Eventos posibles en la infección tuberculosa<sup>6</sup>

## EPIDEMIOLOGÍA

A nivel mundial es la infección humana que presenta al año 10 millones de casos nuevos y 3 millones de muertes, en las mujeres ocasiona 1.7 veces más muertes que las relacionadas con causas maternas, y se informa que un tercio de la población está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, la mayoría de las muertes ocurre en los países en desarrollo, y afecta a la población económicamente activa de dichos países (15-50 años de edad).<sup>2,8</sup>

La TB puede reducir a familias autosuficientes a la condición de mendigos u obligarlas a depender de la asistencia social. El trastorno que ocasiona en la población económicamente activa es irónico, ya que es una de las enfermedades cuyo tratamiento es más eficaz en función del costo.<sup>9</sup>

Los factores que agravan su ocurrencia y control son: crecimiento de la población, pobreza, migración, hacinamiento, mala ventilación, malnutrición, alcoholismo y uso de otras drogas, VIH/SIDA, diabetes y asociación a otras enfermedades las cuales comprometen su estado inmune, desnutrición, manejo y tratamiento inadecuado de pacientes y falta de recursos; cada uno deteriora su control y favorece la resistencia.<sup>5,10</sup>

En 1993 la Organización Mundial de la Salud la declaró como enfermedad reemergente, debido al VIH/SIDA y a la farmacorresistencia.

En México, es endémica, en 1999 ocupaba el 19° lugar como causa de muerte con 3.3 defunciones por 100,000 habitantes y era la 2ª causa debida a un solo agente infeccioso, el 95% de las defunciones ocurre en mayores de 15 años, y en los 10 últimos años el estado con la más alta mortalidad es Chiapas.

En el año 2000 el 82% de los casos nuevos notificados fueron confirmados por laboratorio, 95% ingresó a tratamiento y 25% presentó otro padecimiento como diabetes mellitus con un 11%, desnutrición en 5%, alcoholismo en 4% o VIH/SIDA en 2.5%; además existe evidencia de farmacorresistencia en el país.<sup>5,8</sup>

En ese mismo año se registraron 15,649 casos de TB pulmonar, en donde los estados que presentaron mayor incidencia fueron:

× Tamaulipas

× Baja California

- × Guerrero
- × Veracruz
- × Nuevo León
- × Nayarit

- × Sinaloa
- × Tabasco
- × Chiapas, y
- × Colima

Los estados con menor morbilidad fueron:

- × Tlaxcala
- × Zacatecas
- × Guanajuato
- × Estado de México
- × Distrito Federal
- × Michoacán
- × Yucatán
- × Aguascalientes
- × Puebla, y
- × Jalisco.<sup>8</sup>

## La tuberculosis mina la fuerza laboral de las economías emergentes



Número total de casos de tuberculosis en el período 1990-2000 en personas de 15 a 44 años de edad. Fuente: Estimaciones del Programa Mundial contra la Tuberculosis, OMS

Figura 3. Distribución de TB en el mundo.<sup>9</sup>

## ¿DURMIENDO CON EL ENEMIGO?. AGENTE CAUSAL

Todos en algún momento de nuestra vida nos hemos presentado, esta no es la excepción para el bacilo tuberculoso, el cual pertenece al orden de los *Actinomyces*, género *Mycobacterium*.<sup>11,12</sup>

Este género comprende microorganismos bacilares, inmóviles, no capsulados, aerobios estrictos, que se tiñen con dificultad, pero teñidos resisten la decoloración con ácidos fuertes y alcohol, la tinción más empleada para observarlos es la Ziehl-Neelsen.

Los bacilos tuberculosos son ligeramente curvados, delgados, y su tamaño suele ser de 1 a 4  $\mu\text{m}$  de largo por 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho. Su morfología puede variar en el medio de cultivo desde formas cocoides hasta filamentosas. Las cepas virulentas crecen tanto en la superficie de los medios líquidos como en los sólidos como cordones serpenteantes entretejidos, en donde los bacilos se unen con sus ejes largos en paralelo.<sup>7,12</sup>

*M. tuberculosis* es un aerobio estricto, favorece su desarrollo máximo cuando la  $\text{pO}_2$  es de 100 mm de mercurio o mayor, y la  $\text{pCO}_2$  de 40 mm de Hg, por lo que los órganos más afectados son los que reciben mayor oxigenación.<sup>3</sup> El pH idóneo es de 6.7 a 6.9 y puede crecer en medios sintéticos simples compuestos por glicerol u otros componentes como única fuente de carbono y con sales de amonio como fuente de nitrógeno, asparagina u otros aminoácidos que estimulen el comienzo de la multiplicación y mejoran la tasa de crecimiento. Tiene una preferencia nutritiva hacia los lípidos, por lo que la yema de huevo ha sido un destacado constituyente de los medios de cultivo; aunque es muy sensible a la inhibición por los ácidos grasos de cadena larga, se ve estimulado por éstos a concentraciones muy bajas; se mantiene una concentración satisfactoria al agregar albúmina sérica al medio, que liga a los ácidos grasos con la suficiente afinidad como para mantener libre una baja concentración.<sup>12,14</sup>

El crecimiento de este bacilo es considerado como lento, en comparación con otras bacterias, ya que requiere, bajo condiciones óptimas, de 12 a 20 horas para que suceda la división celular, por lo tanto se necesitan de hasta 6 semanas para observar el crecimiento de un inóculo pequeño.<sup>14</sup>

Las principales especies de bacilos tuberculosos que afectan al hombre por ser patógenos son:

1. *M. tuberculosis*, que es el agente causal en más del 95% de los casos humanos, también puede infectar:

☒ monos  
☒ cerdos

☒ perros  
☒ loros

2. *M. bovis*, que infecta a:

☒ ganado vacuno  
☒ cerdos  
☒ caballos  
☒ y ocasionalmente  
perros, gatos y  
ovejas

☒ en el hombre puede  
ser causa de  
enfermedad debido a  
que no existe control  
de la TB bovina

3. *M. africanum* que ocasiona tuberculosis humana en África tropical, esta especie tiene características fenotípicas intermedias entre las 2 primeras.<sup>6,13</sup>

Además de estas especies, existen otras que son patógenas para el hombre como *M. leprae* (enfermedad: lepra), *M. paratuberculosis* (enfermedad de Crohn).<sup>6</sup> Las micobacterias potencialmente patógenas para el hombre y muchas para los animales se dividen en dos clases:

- a) de crecimiento lento, como el complejo *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* (complejo MAIS), *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. marinum*, *M. xenopi*, *M. szulgai* y *M. simiae*.
- b) de crecimiento rápido, como *M. fortuitum* y *M. chelonae* (o complejo *M. fortuitum*).<sup>13</sup>

## LA ENFERMEDAD. ¿CÓMO SE MANIFIESTA?

La TUBERCULOSIS es una enfermedad que causa gran destrucción de tejidos. Es una enfermedad necrosante, caracterizada por la formación de granulomas nodulares, caseosos, que evolucionan en forma fibrosa, ulcerosa o se calcifican.

En el hombre, los pulmones son los órganos más afectados (90%); sin embargo, pueden resultar lesionados ganglios linfáticos, meninges, riñones o extenderse en todo el organismo (SNC 6%, aparato digestivo 2%



y otras localizaciones 2%).<sup>3,21</sup> La localización más frecuente de tuberculosis en el adulto inmunocompetente es la pulmonar.

Habitualmente, se presenta como una enfermedad de curso subagudo caracterizada por:

- > fiebre de bajo grado de predominio vespertino
- > cansancio
- > pérdida de peso
- > tos persistente
- > sudoración nocturna
- > expectoración
- > y más raramente, hemoptisis.

Radiológicamente, suele presentarse como un infiltrado en lóbulos superiores, con frecuencia cavitado, y no siendo raro el derrame pleural como única manifestación radiológica. Ocasionalmente, en las personas inmunocompetentes, la tuberculosis puede presentarse con afectación extrapulmonar o diseminada. Estas son, sin embargo, las formas clínicas más frecuentes en las personas con SIDA o inmunocomprometidas por otras causas. No es raro el aislamiento de *M. tuberculosis* a partir de la sangre en personas inmunocomprometidas.<sup>32</sup>

## TRATAMIENTO

El tratamiento debe ser estrictamente supervisado (estrategia TAES) por personal de salud o por personal debidamente capacitado, quién verificará la ingesta y deglución del medicamento.<sup>1</sup>

### Tratamiento primario acortado:

Fase Intensiva:	Diario, de lunes a sábado, hasta completar 60 dosis Administración en una toma	
Medicamentos	Separados (dosis)	Combinación fija clave 2414, 4 grageas
Rifampicina	600mg	150 mg
Isoniacida	300 mg	75 mg
Pirazinamida	1,500 mg a 2,000 mg	400 mg
Etambutol (a)	1,200 mg	400 mg
Fase de Sostén:	Intermitente, 3 veces por semana, lunes, miércoles y viernes, hasta completar 45 dosis. Administración en una toma.	
Medicamentos	Separados (dosis)	Combinación fija clave 2415, 4 cápsulas
Isoniacida	800 mg	200 mg
Rifampicina	600 mg	150 mg

(a) usar en personas mayores de 8 años, puede ser reemplazado por estreptomina.

Los casos de TB del SNC y miliar u ósea, ingresan al mismo esquema durante 12 meses o hasta completar 180 dosis. La indicación de este tratamiento debe ser asesorada por el responsable del programa.

## COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA BACTERIA

La característica química más importante de las micobacterias es la abundancia de lípidos céreos en la pared celular, que constituyen más de un 60% de su peso seco, y esto le confiere la denominación de bacilo ácido-alcohol-resistente (BAAR)<sup>14,15</sup>.

El esqueleto de la pared celular está compuesto por 3 estructuras eslabonadas covalentemente: peptidoglicano, arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos.<sup>16</sup> La estructura celular de esta bacteria consta de una gruesa pared separada de la membrana celular por el espacio periplásmico con 4 capas, la más interna es el glicopéptido o peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glicosilmurámico, con cortas cadenas de alanina. Esta capa es el esqueleto de la bacteria, el cual le imparte rigidez y le da forma. Por encima de ella hay otras 3 capas compuestas de:

- 1ª polímeros de arabinosa y galactosa
- 2ª formada por los ácidos micólicos (ácidos grasos derivados), con importancia taxonómica entre micobacterias y nocardias.
- 3ª la más superficial, formada por los sulfolípidos.<sup>7,25</sup>

El peptidoglicano está unido al arabinogalactano (polisacárido ramificado) por enlaces fosfodiéster.

Los ácidos micólicos son  $\beta$ -hidroxiácidos grasos grandes,  $\alpha$ -sustituídos, que se presentan como ésteres unidos a los polisacáridos, en *M. tuberculosis* el único ácido micólico es el factor cordón (6,6'-dimicoliltrehalosa); esta molécula está asociada con la virulencia de dicha bacteria y con una amplia gama de actividades biológicas:

- ▲ citotoxicidad de la membrana celular
- ▲ inhibición de la migración de polimorfonucleares
- ▲ inducción de la formación de granulomas
- ▲ actividad adyuvante
- ▲ actividad antitumoral, y

▲ habilidad para activar la vía alterna del complemento.<sup>12,15,16</sup>

Otra molécula asociada a la virulencia es el 2'-sulfato de 2,3,6,6'-tetraacetiltrehalosa (sulfolípidos de trehalosa), que forma parte de los lípidos asociados con la pared, y que están intercaladas con las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos micólicos, son grupos acil grasos de longitud media ( $C_{24}$  a  $C_{36}$ ) y corta ( $C_{12}$  a  $C_{20}$ ).

Estas moléculas evitan la fusión fagolisosómica que sigue a la fagocitosis de la micobacteria, y permiten de este modo que los microorganismos sobrevivan como parásitos intracelulares facultativos.<sup>15,16</sup>

Esta pared celular se presenta en la figura 4.

## DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la tuberculosis, que es el reconocimiento de los enfermos, se realiza básicamente por medio de la bacteriología, teniendo como apoyo el clínico, la radiología y la reacción de tuberculina (PPD). 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 a éste por un mal diagnóstico; para esto la comunicación y cooperación entre clínicos y personal de laboratorio es necesaria.<sup>17</sup>

La bacteriología posee los recursos técnicos que permiten la demostración del bacilo ácido-alcohol resistente, por medio de la baciloscopia y cultivo. La primera es la técnica fundamental tanto para el diagnóstico bacteriológico de los pacientes sintomáticos respiratorios (con tos productiva) como para el control del tratamiento, debido a que es el método más simple, rápido, específico y barato, además de que identifica a los pacientes más contagiosos<sup>18</sup>.

El cultivo es el método que tiene mayor sensibilidad para determinar la presencia de micobacterias, debido a que puede detectar 10 bacilos/mL en las muestras<sup>17</sup> para que sea positivo, mientras que la baciloscopia requiere de 5,000 a 10,000 bacilos por mL de expectoración<sup>15</sup>, lo que representa una desventaja. La sensibilidad del cultivo es de 80%-85% y la especificidad de 98%.<sup>17</sup>

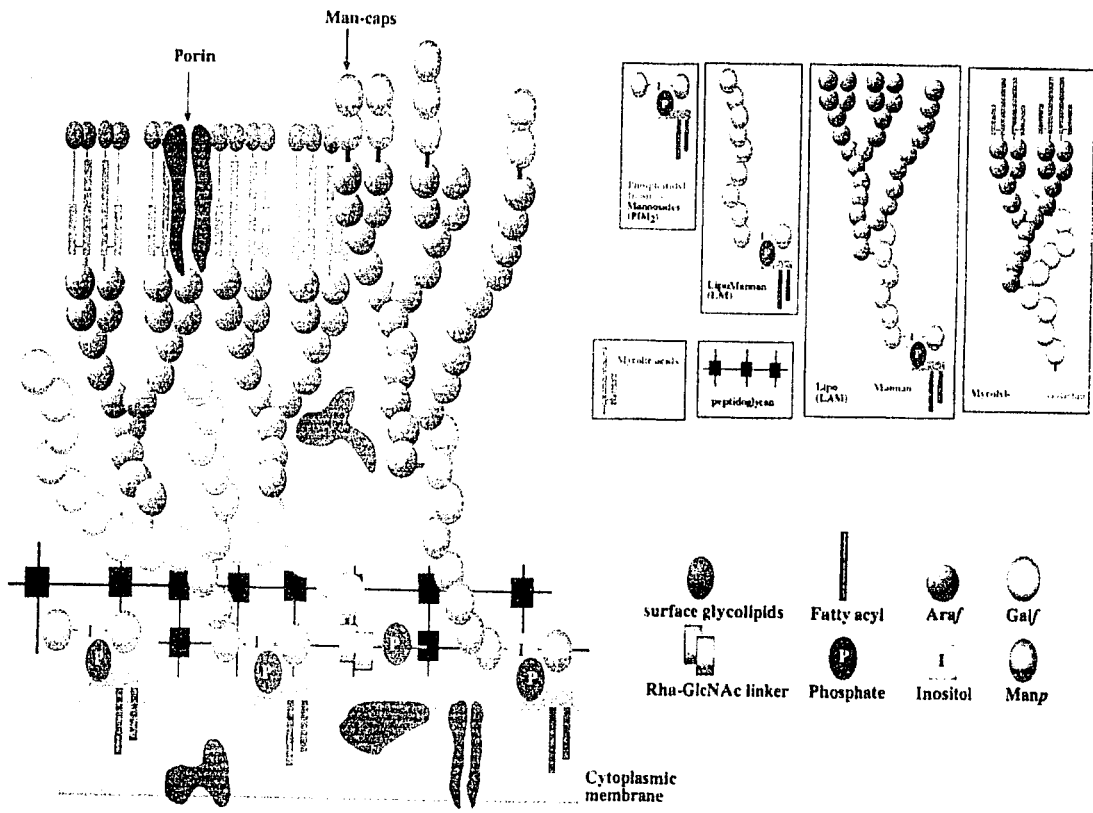


Plate 2 A model of the cell-wall core of *Mycobacterium* and associated lipids and lipoglycans.

Figura 4. Modelo de la Pared Celular de la *Mycobacteria*<sup>16</sup>

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

El diagnóstico definitivo de la tuberculosis requiere el aislamiento de la bacteria en medio de cultivo y su identificación por medio de pruebas bioquímicas y morfológicas. Los medios para el aislamiento están basados en 3 formulaciones generales:

a) Medio agar semisintético (Middlebrook 7H10 y 7H11) que se emplean para observar la morfología colonial y prueba de susceptibilidad; los mismos medios pueden convertirse en selectivos por la adición de antibióticos.

b) Medio a base de huevo (por ejemplo Löwenstein-Jensen) se emplea para desarrollo de los bacilos de muestras de pacientes, en un tiempo aproximado de 3 a 6 semanas, aunque hay cepas que requieren de 8-12 semanas.

c) Medios líquidos ( Middlebrook 7H9 y 7H12) para la proliferación de los inóculos pequeños.

No existe un acuerdo generalizado sobre que medio utilizar, pero se recomienda el uso de un medio de cultivo líquido y un sólido a la par, para aumentar el aislamiento de micobacterias.<sup>15,17,19,20</sup>

## CULTIVO

Todas las muestras clínicas sospechosas de contener micobacterias se deben sembrar en medios de cultivo adecuados por las siguientes razones:

- 1.- Los cultivos son mucho más sensibles que los exámenes microscópicos, pudiendo detectar una cantidad tan pequeña como 10 bacterias por mL de muestra clínica digerida y concentrada.
- 2.- Los aislamientos en cultivo puro son necesarios normalmente para poder identificar las especies de las cepas aisladas.
- 3.- Si la baciloscopia es un índice de la eficacia del tratamiento, el cultivo permite asegurar la negativización y curación del paciente.<sup>32</sup>
- 4.- Se requiere para realizar pruebas de Drogosensibilidad.

Sin embargo, cuando se hicieron los primeros intentos a fines del siglo XIX, la recuperación de micobacterias a partir de un medio de cultivo sobre la base de agar no tuvo buenos resultados, y por medio de la experimentación se encontró que un medio que contenía huevos enteros, fécula de papas, glicerol y sales, solidificado por calentamiento a 85°- 95°C durante 30 a 45 minutos, servía para el aislamiento de *M. tuberculosis*.<sup>15</sup>

Este medio condensado (proceso de solidificación por calor del medio que contiene proteínas), es más susceptible a la licuefacción proveniente de los efectos de las enzimas proteolíticas producidas por bacterias contaminantes que un medio solidificado por el agregado de agar. Posteriormente se descubrió el empleo de colorantes de anilina, como el verde de malaquita o el cristal violeta, para el control de las bacterias contaminantes. El verde de malaquita (oxalato) es el colorante que se agrega con más frecuencia a los medios de cultivo no selectivos en concentraciones que oscilan entre:

- a) 0.025g/100 mL para el medio Löwenstein-Jensen
- b) 0.052g/100 mL para el medio Petraghani
- c) 0.0025g/100 mL para el medio Middlebrook 7H10
- d) 0.0025g/100 mL para el medio Middlebrook 7H11, con la diferencia del anterior que se le adiciona 0.1% de hidrolizado de caseína.

Los medios de Middlebrook contienen agar, lo cual los hace transparentes y permiten la detección precoz del crecimiento después de 10 a 12 días, en lugar de los 18 a 24 días de incubación de los otros medios. Esto se debe parcialmente a la adición de biotina y catalasa para estimular el restablecimiento de los bacilos dañados en las muestras clínicas.<sup>12,15</sup>

© MEDIOS SELECTIVOS: Son aquellos medios que contienen agentes antimicrobianos para suprimir la contaminación bacteriana y micótica. Aunque ciertos agentes antimicrobianos reducen la contaminación, también pueden inhibir el crecimiento de las micobacterias, por lo que deben ser controlados los tiempos de exposición.<sup>15</sup> Entre estos medios tenemos:

- a) L-J, modificación de Gruft: contiene RNA 5mg/100 mL, penicilina 50 U/mL, ácido nalidixico 35 µg/mL

- b) L-J: cicloheximida 400 µg/mL, lincomicina 2µg/mL, ácido nalidixico 35 µg/mL
- c) Middlebrook 7H10: cicloheximida 360 µg/mL, lincomicina 2µg/mL, ácido nalidixico 20 µg/mL
- d) Selectivo 7H11 (medio de Mitchison): no contiene verde de malaquita, carbenicilina 50 µg/mL, anfotericina B 10 µg/mL, polimixina B µg/mL y lactato de trimetoprima 20 µg/mL.<sup>15</sup>

### ☺ MEDIOS LÍQUIDOS DE LECTURA MANUAL

\*El sistema Septi-Chek MB (Becton Dickinson): consiste en un medio bifásico de 20 mL de caldo Middlebrook 7H9 enriquecido con CO<sub>2</sub>, suplementado con factores de crecimiento y antibióticos, al que se le acopla en la parte superior después de la inoculación de la muestra un dispositivo. Este dispositivo tiene tres medios de cultivo, por un lado un agar Middlebrook 7H11 no selectivo, que permite el crecimiento de la mayoría de las micobacterias y, por otro lado, dos secciones, una con un medio modificado de Löwenstein-Jensen, y otra con agar chocolate para detectar contaminaciones. El medio líquido es invertido sobre la fase sólida inicialmente y a intervalos durante la incubación. El sistema se revisa visualmente. El crecimiento se detecta tanto en el medio líquido como en la fase sólida.

Ventajas: Ofrece la posibilidad de disponer un crecimiento sobre la fase sólida que puede utilizarse para practicar pruebas de identificación sin necesidad de realizar resiembras adicionales, y además facilita la detección de cultivos mixtos.

Desventajas: Los principales inconvenientes del Septi-Check MB son la lentitud en la detección del crecimiento con respecto al sistema BACTEC 460 TB, no permite realizar estudios de sensibilidad in vitro y falla con frecuencia el sistema de identificación presuntiva de tuberculosis que lleva incorporado en su fase sólida.

\*El medio de cultivo Mycobacterial Growth Indicador Tube (MGIT) (Becton Dickinson), utiliza también un caldo de Middlebrook 7H9 al que se incorpora un sensor fluorescente formado por un compuesto de rutenio pentahidratado sobre una base de silicona sensible al O<sub>2</sub>. A medida que se produce crecimiento bacteriano se consume O<sub>2</sub> y esto permite observar fluorescencia en el tubo mediante el uso de un transiluminador de luz ultravioleta de 362 nm.

Ventajas: Este medio en la actualidad está automatizado.

Desventajas: presenta falsos positivos, tubos en los cuales existe fluorescencia pero en los que la baciloscopia y el cultivo son negativos para *Mycobacterium* spp. El número de estos falsos positivos podría disminuir con la experiencia. Actualmente, existen limitaciones en la realización directa de sondas de identificación y antibiogramas, que en un futuro, podrían solucionarse.

## ☺ MEDIOS LÍQUIDOS DE LECTURA SEMIAUTOMÁTICA

\*El sistema BACTEC 460 TB, es el más ampliamente evaluado, utiliza el medio de cultivo líquido Middlebrook 7H12 y como sustrato ácido palmítico marcado con <sup>14</sup>C. Durante el crecimiento bacteriano se produce <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, que es detectado por el sistema y lo traduce en índice de crecimiento.

Desventaja: Este sistema utiliza reactivos radiactivos, es semiautomatizado y requiere de una amplia manipulación de los viales a lo largo de todo el período de incubación. Además existen falsos positivos por contaminación de *M. tuberculosis* de un vial positivo a otro que probablemente no lo era.

En la actualidad, se están evaluando varios métodos automatizados para el cultivo de *Mycobacterium* spp. en medio líquido, todos ellos adaptados de los sistemas automáticos de hemocultivos, utilizando medios de cultivos apropiados y sistemas capaces de detectar micobacterias de muestras clínicas.



## ☺ MEDIOS LÍQUIDOS DE LECTURA AUTOMÁTICA

\*Sistema ESP, utiliza un vial conteniendo el medio líquido 7H9 modificado suplementado con OADC para el enriquecimiento. Cada vial lleva incorporado una esponja de celulosa que permite una mayor área de superficie para el crecimiento de la micobacteria. El sistema puede detectar micobacterias de esputo, sangre, heces, jugo gástrico, etc, basándose en una medida manométrica de consumo de oxígeno.

\*El sistema MB/Bact, utiliza el medio líquido Middlebrook 7H9 modificado. Cada botella lleva incorporada en la base un sensor colorimétrico que detecta la presencia de CO<sub>2</sub> como indicador de crecimiento bacteriano. El cambio de color, de verde a amarillo es monitorizado continuamente por un reflectómetro que se halla en la unidad de detección. Estos valores medidos cada 10 minutos son transmitidos a un ordenador, que basándose en un sofisticado algoritmo, indica que en el medio existe crecimiento bacteriano.

En estos sistemas se realiza la incubación y la lectura automáticamente. El sistema lo detecta como positivo o lo descarta como negativo, sin que se produzca ninguna manipulación desde que la botella es introducida en el sistema. También se encuentra actualmente en desarrollo otro sistema MGIT 960, que automatiza el antiguo sistema manual.<sup>32</sup>

## CONTROL DE CALIDAD

El cultivo es el estándar de oro para el diagnóstico de enfermedades infecciosas y particularmente para Tuberculosis. Así, evaluar la **Calidad** de la técnica del cultivo es tarea compleja, debido a la multitud de factores (calidad y manejo de la muestra previo al proceso de aislamiento, principalmente), no obstante, la aptitud del medio de cultivo para que se lleve a cabo la duplicación de los bacilos es una parte fundamental para el éxito.

La **Calidad** es la capacidad de satisfacer las necesidades del cliente en cuanto a productos y servicios, y este concepto no se limita a la ejecución técnica de productos o servicios, si no también al conjunto de las actividades de las instituciones o empresas.

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

**Calidad** implica la participación de todo el personal de la entidad y pone énfasis en la satisfacción del cliente, lo cual permite un sistema multidimensional y dinámico que involucra a un proveedor con calidad asegurada, una empresa con su proceso de Gestión de Calidad y un cliente satisfecho.

Validar un proceso cualquiera significa verificar que el procedimiento seguido es el adecuado para obtener el fin propuesto.

El concepto de validación es de especial interés en el análisis microbiológico, ya que forma parte de la Calidad.

Validar el proceso de búsqueda de un microorganismo en una muestra significa demostrar la presencia de éste con la técnica empleada. Validar es tener una apreciación objetiva de la Calidad del proceso mediante datos numéricos del recuento de UFC (unidades formadoras de colonias) a partir de un inóculo de concentración conocida.<sup>33</sup>

Así, para asegurar la garantía de utilización de los medios de cultivo, éstos deben someterse a tres tipos de control:

- a) para verificar la ausencia de contaminantes (prueba de esterilidad)
- b) para comprobar que bacteriológicamente cumple los fines para los que está destinado (Promoción del desarrollo), y
- c) saber su límite de utilización (control de caducidad).<sup>34</sup>

Este Control de Calidad debe ser aplicado a todo medio que se emplee para diagnóstico. Sin embargo, no existe un documento expedido por la Secretaría de Salud, o cualquier otra dependencia, en el cual se establezca de forma específica una metodología para el medio L-J que asegure su garantía de utilización; ya que el material bibliográfico<sup>58</sup> proporcionado, únicamente hace mención del Control de Calidad en medios que se emplean normalmente en el Laboratorio Clínico, olvidando los medios especiales que aíslan determinado microorganismo.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

La distribución de la tuberculosis es mundial, y en México es la decimonovena causa de muerte (1999); la curación depende del diagnóstico certero y tratamiento oportuno, para lo cual, se emplea el cultivo, que es el método bacteriológico más sensible y específico para descubrir la presencia de micobacterias en las muestras, en especial, para los casos donde los bacilos son escasos. Sin embargo, no se encuentra sistematizado ni el más elemental método de control de calidad, en cuanto a la valoración de la eficiencia del medio de cultivo, materia prima de la cual depende en gran parte el éxito en el aislamiento de las bacterias.

Por tal razón se propone realizar un estudio de control de calidad mediante la promoción del desarrollo de *M. tuberculosis* cepa de referencia H37Rv ATCC 27294 en lotes de medio Löwenstein-Jensen de 4 diferentes procedencias.

## OBJETIVO GENERAL

---

- ✓ Demostrar la calidad de los lotes de medio de cultivo Löwenstein-Jensen de diferentes procedencias, mediante la promoción del desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294.

## OBJETIVOS PARTICULARES

---

- \* Estandarizar la suspensión de *M. tuberculosis* (inóculo) por nefelometría de McFarland.
- \* Realizar el registro de las características físicas de los distintos lotes, así como la cuenta viable de *M. tuberculosis* en los medios de cultivo de 4 diferentes procedencias.
- \* Obtener los valores de la **RELACIÓN DEL NÚMERO DE COLONIAS (RNC)** de *M. tuberculosis* H37Rv para cada uno de los lotes del ensayo en el primer mes a partir de su preparación.
- \* Determinar el efecto de la conservación de 1 a 12 meses de un lote de medio Löwenstein-Jensen mediante los valores mensuales de RNC.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## HIPÓTESIS

---

- ✦ Los lotes de medio de cultivo Löwenstein-Jensen de distintos orígenes inoculados con una suspensión estándar de *M. tuberculosis* darán RNC similares en cada ensayo.
- ✦ La calidad (RNC) será constante para los lotes preparados en distintas ocasiones de un mismo origen.
- ✦ Los valores de RNC de un lote de medio Löwenstein-Jensen en los ensayos mensuales en un lapso de 12 meses, irá disminuyendo “significativamente”.

## TIPO DE ESTUDIO

- ❖ Experimental, longitudinal, comparativo y prospectivo

## CRITERIO DE INCLUSIÓN

- Cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv con tercera semana de crecimiento e incubación a 37°C
- Medios de cultivo con preparación reciente a la fecha de la realización del ensayo (del mes)

## CRITERIO DE ELIMINACIÓN

- Medios contaminados
- Cepa que no tenga tres semanas de incubación

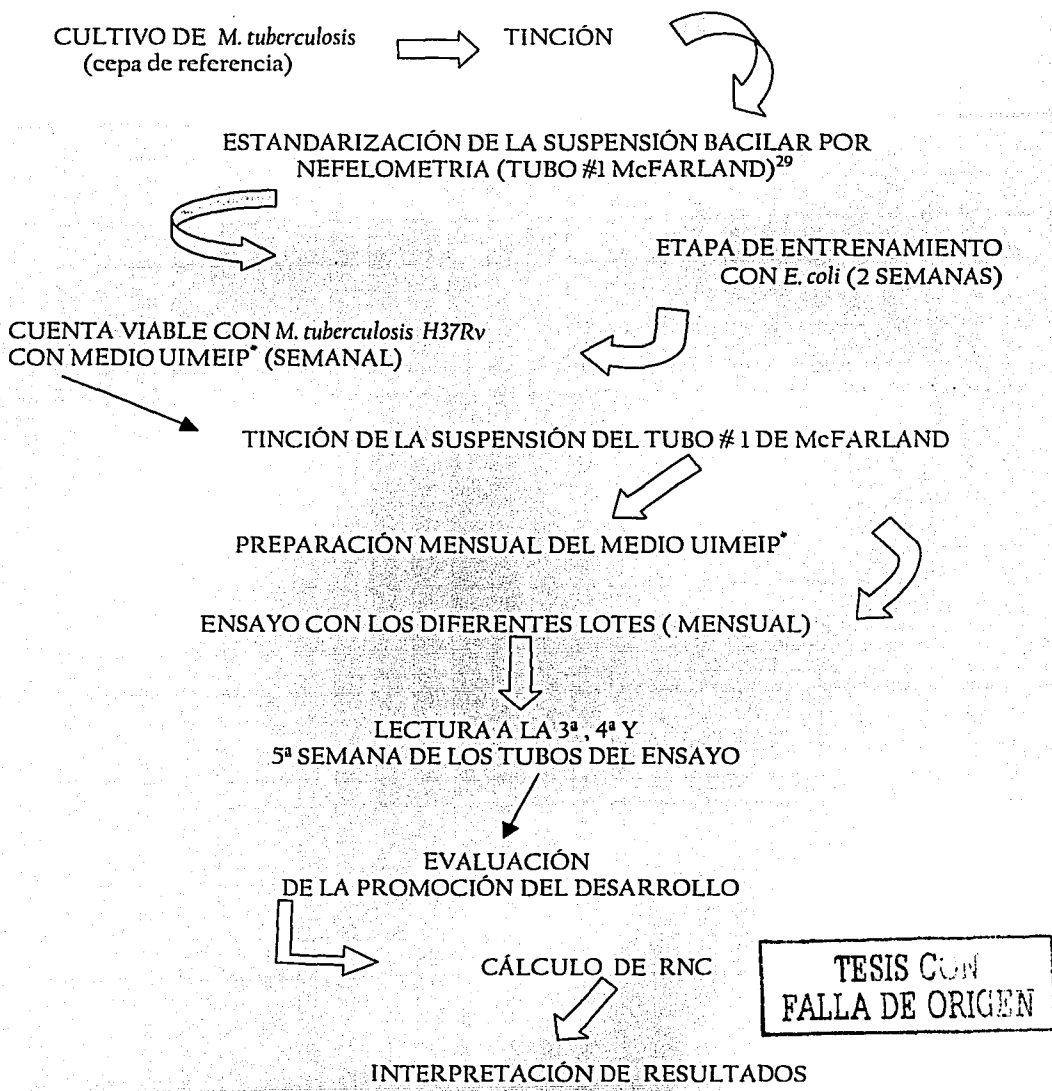
## VARIABLES DEPENDIENTES

- Tiempo en el que el proveedor trae el medio
- Cuenta viable de *M. tuberculosis*

## VARIABLE INDEPENDIENTE

- Suspensión estándar de *M. tuberculosis* (tubo #1 de McFarland)

# DIAGRAMA DE FLUJO



\* UIMEIP: Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Casa Comercial A



## MATERIAL Y MÉTODOS

### ✓ MATERIAL:

- ❖ Cultivo de 3 semanas de incubación de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv ATCC 27294
- ❖ Lotes de medio Löwenstein-Jensen (L-J) de diferente procedencia: Casa Comercial A, Casa Comercial B, Casa Comercial C, Casa Comercial D. De cada mes. Y un lote de la Casa Comercial B para Caducidad.

### ✓ REACTIVOS

- \* NaOH AL 2%
  - \* Etanol al 70%
  - \* Fosfato monopotásico anhidro
  - \* Sulfato de magnesio
  - \* Citrato de magnesio
  - \* L-asparagina
  - \* Verde de malaquita (oxalato)
  - \* Regulador de fosfatos pH 6.8 estéril
  - \* Glicerina bidestilada
- SUPLEMENTO: \*Huevo fresco libre de antibióticos y patógenos

### ✓ EQUIPO

- ☺ Campana de bioseguridad Nuair, Class II type A/B3 modelo No. Un-440-400
- ☺ Espectrofotómetro Jenway 6405UV/Vis
- ☺ Agitador Fisher Vórtex Genie 2 cat No. 12-812
- ☺ Microscopio Zeiss mod. K-70
- ☺ BACTEC TB 460 system Becton-Dickinson
- ☺ Coagulador J.M. Ortiz No. 774

## ✓ MÉTODO

### ❖ ESTANDARIZACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE *M. tuberculosis* PARA OBTENER EL INÓCULO DE LA CUENTA VIABLE:

- Preparación de la suspensión bacilar por comparación visual:

1<sup>er</sup> intento: Realizar una suspensión peso /volumen<sup>26</sup>: pesar en un tubo de 13X100 2 mg de masa bacilar y disgregar con un aplicador con punta afilada en las paredes del tubo, posteriormente suspenderlo en 1 mL de regulador de fosfatos pH 6.8, comparar de forma visual con el tubo #1 de McFarland.

2<sup>o</sup> intento: Preparar una suspensión bacilar de turbidez semejante al tubo #1 de McFarland, compararlo ópticamente y con lectura en espectrofotómetro.

- Preparación de la suspensión bacilar por el método de las proporciones de Cannetti, Rist y Grosset<sup>22</sup> y Cuenta viable: protocolo del centro de referencia de Buenos Aires, Argentina (InDRE)<sup>27</sup>:

3er intento:

Mantener por medio de resiembra en medio L-J la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294.

## PROMOCIÓN DEL DESARROLLO

En una gradilla colocar los tubos de medio de las 4 diferentes Casas Comerciales (A, B, B Caducidad, C y D) por dilución, y posteriormente:

- a) disponer de una cepa de *M. tuberculosis* con incubación de 3 semanas (fase de crecimiento logarítmico)

- b) retirar toda la masa bacilar posible con un aplicador de madera con punta afilada, teniendo cuidado de no raspar el medio.
- c) colocar en un matraz Erlenmeyer de 50mL estéril que contiene 10 perlas de vidrio y adicionar 200 microlitros de regulador de fosfatos pH 6.8 estéril
- d) agitar vigorosamente durante 5 minutos a modo de conseguir la mayor dispersión bacilar
- e) adicionar 4 mL de regulador de fosfatos pH 6.8 estéril y seguir agitando
- f) transvasar a un tubo de 16x150, y dejar en reposo por 15 minutos para que sedimenten las partículas grandes
- g) transferir el sobrenadante a una celda para leer en el espectrofotómetro a  $580 \text{ nm}^{28}$ , ajustar la absorbancia de 0.256 a 0.302, rango correspondiente al tubo No. 1 de McFarland.
- h) realizar diluciones seriadas:  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $0.5 \times 10^{-4}$ ,  $0.2 \times 10^{-4}$  y  $0.5 \times 10^{-5}$
- i) inocular 0.2 mL de las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en la muestra de 10 tubos proporcionados por las diferentes Casas Comerciales (5 tubos por dilución), previamente seleccionados al azar y rotulados
- j) distribuir el inóculo en toda la superficie del medio por movimientos oscilatorios hasta la completa absorción del líquido, e incubar en posición inclinada por 48 h a  $37^{\circ}\text{C}$
- k) realizar ensayos semanales con las diluciones  $0.2 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $0.5 \times 10^{-5}$  con el medio de la Casa Comercial A, 5 tubos por dilución
- l) observar a las 48 h cada tubo para comprobar la ausencia de contaminantes. Continuar la incubación en posición vertical y realizar el recuento de colonias al cumplir la 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> semanas de inoculados.

## EVALUACIÓN DE LA DISPERSIÓN BACILAR Y VIABILIDAD

Realizar la comprobación de la dispersión bacilar de *M. tuberculosis* por microscopía y viabilidad por el método radiométrico. (anexo 1)

❖ **DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS TUBOS CON MEDIO L-J DE LOS DIFERENTES LOTES DE CADA PROVEEDOR (CASA COMERCIAL):**

- a) **COLOR:** determinar por la comparación de cada tubo con el patrón de colores de Sherwin Williams números 61,65,103,106; de ahí la connotación sw1717 (por ejemplo).
- b) **BURBUJAS:** las burbujas están expresadas con claves que reflejan la cantidad de éstas que presenta cada tubo:  
B1= 1 a 9 burbujas  
B2= 10 a 20 burbujas, y  
B3 > 20 burbujas.
- c) **pH:** retirar el agua de condensación de cada tubo y por lote con una pipeta Pasteur, colocar en un tubo limpio y tomar el valor de éste con tiras reactivas.
- d) **CONTAMINACIÓN ⊗:** observar en el medio la presencia de colonias y descartar el tubo que presente algún indicio de desarrollo microbiano.

Banner Mint X SW1449

Valleyview X SW1450

Silver Spring X SW1451

Mint Tint X SW1452

Verde A SW1453

Water Lily Z SW1454

Formal Garden M SW1455  
Samples approximate the actual paint color

Primitive Green X SW1421

Farm Fresh X SW1422

Celery Bunch X SW1423

Dapper X SW1424

Tropic Forest X SW1425

Vert Olive Z SW1426

Frog R SW1427  
Samples approximate the actual paint color

Biscayne Bay X SW1736

Warm Spring X SW1737

Wafercolor X SW1738

Sea Star X SW1739

Tropicana Y SW1740

Zuni Turquoise Z SW1741

Give'chy Green R SW1742  
Samples approximate the actual paint color

Lime Crush X SW1715

Country Meadow X SW1716

Pale Spearmint X SW1717

Minly X SW1718

Apple Orchard Y SW1719

Green Parakeet Z SW1720

Seaside Garden P SW1721  
Samples approximate the actual paint color

TESIS COM  
FALLA DE ORIJAN

30

❖ **PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO: MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO INDRE/SAGAR: 18. TUBERCULOSIS, pp. 94-95<sup>22</sup> (CASA COMERCIAL A)**

MATERIAL:

- \*25 piezas de huevo fresco libre de antibiótico y patógenos
- \*Tubos de 15x120 con tapa de baquelita (estériles)
- \*Matraz Erlenmeyer 2L (estéril)

Todo el material de vidrio fue tratado con HCl 1%, para eliminar cualquier resto de detergente. (anexo 2)

PROCEDIMIENTO:

1 <sup>er</sup> día	<p>Preparación de la base de sales (esterilizar a 121°C por 15 min)</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Fosfato monopotásico anhidro</td> <td style="text-align: right;">2.4g</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Sulfato de magnesio</td> <td style="text-align: right;">0.24g</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Citrato de magnesio</td> <td style="text-align: right;">0.6g</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">L-asparagina</td> <td style="text-align: right;">3.6g</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Glicerina bidestilada</td> <td style="text-align: right;">12 mL</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Agua destilada</td> <td style="text-align: right;">600 mL</td> </tr> </table> <p>Pesar las sales, disolverlas en el agua caliente y adicionar la glicerina</p>	Fosfato monopotásico anhidro	2.4g	Sulfato de magnesio	0.24g	Citrato de magnesio	0.6g	L-asparagina	3.6g	Glicerina bidestilada	12 mL	Agua destilada	600 mL
Fosfato monopotásico anhidro	2.4g												
Sulfato de magnesio	0.24g												
Citrato de magnesio	0.6g												
L-asparagina	3.6g												
Glicerina bidestilada	12 mL												
Agua destilada	600 mL												
2 <sup>o</sup> día	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Verde de malaquita al 2%</td> <td style="text-align: right;">20 mL</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Huevos enteros</td> <td style="text-align: right;">1000mL</td> </tr> </table> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Colocar las 25 piezas de huevo fresco, con mucho cuidado, en un vaso de precipitado de 1L, cubrirlos con NaOH al 2% por 30 min, posteriormente cepillar y enjuagar en agua corriente</li> <li>✓ Escurrir y cubrir con etanol al 70% por 30 min, secar con un trapo estéril</li> <li>✓ Preparar el homogenizado de huevo rompiendo uno a uno, observar la integridad y conservación de la yema, y adicionar en el matraz de 2L batiendo (contiene vidrios estériles)             <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mezclar</li> </ul> </li> </ul> <p style="text-align: center;">Base de sales 600mL + verde de malaquita 20mL + 1000mL de homogenizado de huevo → 15 min a vacío</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Repartir a cada tubo 7mL de medio</li> <li>✓ Coagular por 40min a 80-82°C</li> <li>✓ Someter a prueba de esterilidad por 48 h</li> </ul>	Verde de malaquita al 2%	20 mL	Huevos enteros	1000mL								
Verde de malaquita al 2%	20 mL												
Huevos enteros	1000mL												
5 <sup>o</sup> día	<p>Etiquetar los tubos (L-J fecha de preparación)</p> <p>Conservar el medio en el cuarto frío</p> <p style="text-align: center;">Cantidad de tubos preparados: 200 tubos</p>												

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DISEÑO ESTADÍSTICO

Se realizará estadística descriptiva e inferencial:

- ☒ ANDEVA de un factor en el diseño completamente aleatorio con  $\alpha=5\%$ , y
- ☒ Prueba de hipótesis acerca de la diferencia de 2 medias con  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$  desconocidas y diferentes, con  $\alpha=5\%$ .

### ► CÁLCULO DE LA RELACIÓN DEL NÚMERO DE COLONIAS (RNC)

El RNC es el cociente del crecimiento de colonias a la 3<sup>a</sup> semana/ colonias de la 5<sup>a</sup> semana (con una dilución  $10^{-5}$ )

# RESULTADOS

## ESTANDARIZACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE *M. tuberculosis*:

### 1.º Peso / volumen:

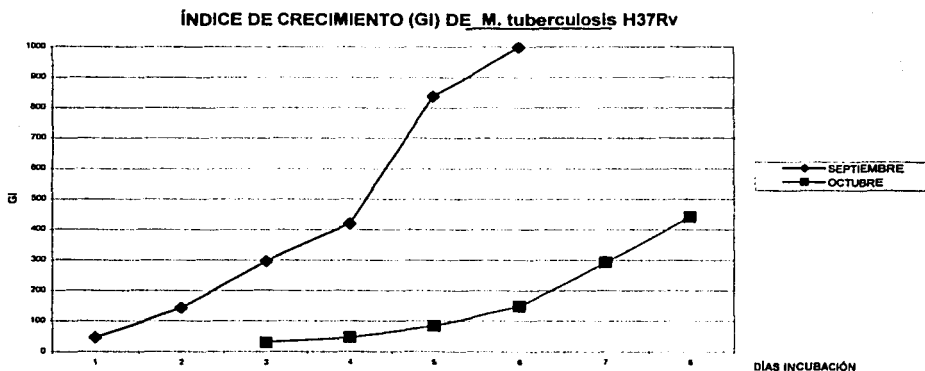
1er intento: no se obtuvo una suspensión bacilar, observada por microscopía y método radiométrico, lo suficientemente dispersa como para obtener una cuenta viable satisfactoria.

2º intento: el grado de dispersión bacilar tampoco fue satisfactorio, esto se observó por microscopía, método radiométrico y comparación en el espectrofotómetro con el tubo #1 de McFarland.

### 2.º Método definitivo:

3er intento: la dispersión bacilar por este método permitió tener una suspensión más homogénea que las 2 primeras. Esto es válido porque se verifico por:

- Espectrofotometría: comparación con el tubo #1 de McFarland, en donde está ubicado en un rango de absorbancias (0.256 - 0.302)
- microscopía: observación de la dispersión bacilar
- viabilidad de los bacilos con el equipo radiométrico BACTEC 460 TB: el resultado que expresa el desarrollo bacteriano es la duplicación del GI de un día a otro, Gráfica 1.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## ☼ DILUCIONES SERIADAS:

Las diluciones empleadas en los ensayos semanales son las expresadas en la relación a continuación descrita en la TABLA A:

COLONIAS ESPERADAS POR TUBO CON UN INÓCULO DE 0.2 mL

TABLA A

$3 \times 10^7$ bacilos/mL <sup>28</sup>		
↓		
$1 \times 10^{-4}$		
$0.2 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-5}$	$0.5 \times 10^{-5}$
↓	↓	↓
600 col/ mL	300 col/ mL	150 col/ mL
↓	↓	↓
<b>120 col/ 0.2mL</b>	<b>60 col/ 0.2 mL</b>	<b>30 col/ 0.2 mL</b>

La cifra inicial es la suspensión madre de la cual se parte y corresponde al tubo #1 de McFarland. A continuación se expresan las diluciones realizadas y posteriormente el número de colonias esperadas por tubo en cada dilución, con un inóculo de 0.2 mL (cifras en negritas).

Las diluciones empleadas en los ensayos semanales son **seriadas** y la proporcionalidad entre cada una se observa en la TABLA B:

PROPORCIONALIDAD DE LAS DILUCIONES EMPLEADAS EN CUENTA VIABLE SEMANAL

TABLA B

PERIODO	DILUCIÓN		
	$0.2 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-5}$	$0.5 \times 10^{-5}$
Número de colonias promedio			
Marzo 01	14	6	2
Julio 01	18	4	2
Oct 01/ Abril 02	11	7	0

En esta tabla se muestran 3 fechas que pertenecen a ensayos iniciales, intermedios y finales a lo largo de un año, en los cuales se aprecia el duplicado del número de colonias promedio, correlación esperada.

✳ CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS 4 DIFERENTES MEDIOS PROPORCIONADOS POR LAS DISTINTAS CASAS COMERCIALES Y CUENTA VIABLE DE CADA LOTE:

En las tablas 1 a la 5 se recopilaron las características físicas de los medios antes de ser inculados y el resultado de la cuenta viable expresado como el número de colonias a la 5ª semana, la media (X), RNC, desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV).

Los cocientes plasmados en las características físicas indican que el numerador es el número de tubos que posee tal característica y el denominador es el total de tubos ensayados.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS PREVIAS A LA INOCULACIÓN Y RESULTADOS DE LA PROMOCIÓN DEL DESARROLLO DEL MEDIO L-J CASA COMERCIAL "A"

TABLA 1

IDENTIFICACIÓN DEL LOTE	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE L-J			NÚM. TOTAL DE COLONIAS A LA 5ª SEMANA DILUCIÓN 10 <sup>1</sup>	MEDIA DE LOS 5 TUBOS ENSAYADOS	RNC	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)
	AGUA DE CONDENS. pH	COLOR	BURBUJAS					
FEB 01 300101	—	10/10 sw1717	B1 8/10	20	4	0.70	1.5	39.5%
MARZO 01 200301	2/10 pH 7	10/10 sw1716	B2 9/10	347	69.4	0.84	10.3	15%
ABRIL 01 270401	20/20 pH 7	12/20sw1738 8/20sw1737	—	59	11.8	0.59	8.8	74.5%
MAYO 01 180501	20/20 pH 7	20/20 sw1737	B1 5/20	52	10.4	1.21	5.68	54.6%
JUNIO 01 270601	20/20 pH 7	20/20 sw1717	—	23	4.6	0.34	5.36	116.5%
JULIO 01 160701	20/20 pH 7	20/20 sw1449	B1 4/20	141	28.2	1.50	25.86	102.6%
AGOSTO 01 210801	19/20 pH 7	20/20 sw1738	B1 2/20	5	1	0	1	100%
SEPTIEMBRE 01 250901	20/20 pH 7	20/20 sw1718	—	0	0	0	0	0
OCTUBRE 01 161001	20/20 pH 7	20/20 sw1717	—	51	10.2	0.88	4.91	48.13%
NOVIEMBRE 01 211101	15/20 pH 7	18/20sw1716 2/20sw1449	B1 2/20	13	2.6	1	1.81	69.61%
DICIEMBRE 01 211101	20/20 pH 7	20/20 sw1717	—	12	2.4	0.083	4.82	200%
ENERO 02 230102	14/20 pH 7	20/20 sw1716	B1 1/20	4	0.8	1	0.447	56%
FEBRERO 02 120302	14/20 pH 7	6/20sw1449† 14/20sw1449	—	25 ⊗	5 ⊗	0.44	5.19	104%

NOTA: Los tubos empleados para envasar el medio son de vidrio de 20X125, con tapa de rosca de baquelita y el volumen del medio de 7mL ⊗ En el mes de Febrero 02 lote 120302, un tubo de 20 a las 48 h de incubado estaba contaminado.

**CARACTERÍSTICAS FÍSICAS PREVIAS A LA INOCULACIÓN Y  
RESULTADOS DE LA PROMOCIÓN DEL DESARROLLO DEL MEDIO  
L-J CASA COMERCIAL "B"**

**TABLA 2**

IDENTIFICACIÓN DEL LOTE	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE L-J			NÚM. TOTAL DE COLONIAS A LA 5ª SEM. DILUCIÓN 10 <sup>3</sup>	MEDIA DE LOS 5 TUBOS ENSAYADOS	RNC	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)
	AGUA DE CONDENS. pH	COLOR	BURBUJAS					
FEB 01 MLJ-276	8/10 pH 7	5/10sw1736 5/10sw1449	B3 1/10	50	10	0.28	12.4	124%
MARZO 01 MJL-279	5/10 pH 7	10/10 sw1737	—	185	37	0.61	11.7	31.6%
ABRIL 01 MLJ-288	10/10 pH 7	10/10 sw1736	—	20	4	0.25	2.4	60%
MAYO 01 MLJ-292	10/10 pH 7	10/10 sw1736	B1 3/10	65	13	1.32	9.7	75%
JUNIO 01 MLJ-295	10/10 pH 7	10/10 sw1736	B1 1/10	41	4.1	0.43	3.14	76.5%
JULIO 01 MLJ-301	10/10 pH 7	10/10 sw1736	—	23	4.6	0.73	2.4	52%
AGOSTO 01 MLJ-304	10/10 pH 7	10/10 sw1736	B1 2/10	2	0.4	0.5	0.54	135%
SEPTIEMBRE 01 MLJ-307	10/10 pH 7	10/10 sw1736↑	B1 1/10	2	0.4	1	0.54	136.7%
OCTUBRE 01 MLJ-312	3/10 pH 7	10/10 sw1449	B1 4/10	32	6.4	0.81	3.28	51.56%
NOVIEMBRE 01 MLJ-314	10/10 pH 7	10/10 sw1736	B1 4/10	10	2	0.40	1.22	61%
DICIEMBRE 01 MLJ-315	10/10 pH 7	10/10 sw1736	—	12	2.4	0.166	4.27	178%
ENERO 02 MLJ-315	10/10 pH 7	10/10 sw1736↑	B1 5/10	0	0	0	0	0
FEBRERO 02 MLJ-317	10/10 pH 7	10/10 sw1736↑	B1 5/10	20	4	1	2.44	61.2%
MARZO 02 MLJ-318	10/10 pH 7	10/10 sw1736	—	11	2.2	0.909	1.643	74.7%
ABRIL 02 MLJ-321	10/10 pH 6	10/10 sw1737	B1 2/10	41	8.2	0.268	3.5	42.6%

NOTA: El tipo de tubo empleado para envasar este medio son de vidrio de 16X150 para el lote MLJ-276 y tapa de rosca de baquelita, los demás lotes son de 20X125, con tapa de rosca de plástico.

\*\*\*El volumen del medio es de 7mL, y lo especifica en el marbete.

**CARACTERÍSTICAS FÍSICAS PREVIAS A LA INOCULACIÓN Y  
RESULTADOS DE LA PROMOCIÓN DEL DESARROLLO DEL MEDIO  
L-J CASA COMERCIAL "B CADUCIDAD"**

**TABLA 3**

IDENTIFICACIÓN DEL LOTE	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE L-J			NÚM. TOTAL DE COLONIAS A LA 5ª SEM. DILUCIÓN 10 <sup>-5</sup>	MEDIA DE LOS 5 TUBOS ENSAYADOS	RNC	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)
	AGUA DE CONDEN. pH	COLOR	BURBUJAS					
<b>LOTE MLJ-288</b>								
ABRIL 01	10/10 pH 7	10/10 sw1736	—	20	4	0.25	2.4	60%
1° MAYO 01	10/10 pH 7	10/10 sw1736	—	27	5.4	0.96	2.07	38%
2° JUNIO 01	6/10 pH 7	10/10 sw1736↑	—	14	2.8	0.5	1.78	63.5%
3° JULIO 01	10/10 pH 7	10/10 sw1736	—	27	9.51	0.55	10.48	110%
4° AGOSTO 01	8/10 pH 8	10/10 sw1736	BI 1/10	3	0.6	0	0.54	90%
5° SEPT 01	10/10 pH 7	10/10 sw1736	BI 10/10	41	8.2	0.024	17.18	217%
6° OCTUBRE 01	10/10 pH 7	10/10 sw1740	BI 10/10	45	9	0.44	3.53	39%
7° NOV 01	10/10 pH 8	10/10 sw1736↑	BI 10/10	25	5	0.08	4.84	97%
8° DIC 01	10/10 pH 7	10/10 sw1449	—	22	4.4	0.09	9.28	211%
9° ENERO 02	10/10 pH 7	10/10 sw1736	—	2 ⊗	0.5 ⊗	0.5	0.57	115%
10° FEB 02	9/10 pH 7	10/10 sw1736	BI 2/10	22	4.4	0.227	7.16	163%
11° MARZO 02	10/10 pH 7	10/10 sw1736	—	57	11.4	0.175	12.01	105%
12° ABRIL 02	10/10 pH 8	10/10 sw1736	BI 2/10	65	13	0.2	13.6	105%

NOTA: Los tubos de los 12 ensayos son de vidrio de 20X125, con tapa de rosca de plástico y 7 mL de medio.

⊗ En el mes de Enero un tubo de los 10 presentó contaminación a las 72h de incubado.

**CARACTERÍSTICAS FÍSICAS PREVIAS A LA INOCULACIÓN Y  
RESULTADOS DE LA PROMOCIÓN DEL DESARROLLO DEL MEDIO  
L-J CASA COMERCIAL "C"**

**TABLA 4**

IDENTIFICACIÓN DEL LOTE	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE L-J			NÚM. TOTAL DE COLONIAS A LA 5ª SEM. DILUCIÓN 10 <sup>-3</sup>	MEDIA DE LOS 5 TUBOS ENSAYADOS	RNC	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)
	AGUA DE CONDENS. pH	COLOR	BURBUJAS					
FEBRERO 01 2520000	—	10/10 sw1449	B1 3/10	13	2.6	0.84	0.89	34%
MARZO 01 2520083	—	10/10 sw1716	B1 4/10	155	31	0.96	10.6	34.3%
ABRIL 01 2520105	—	10/10 sw1717	B1 3/10	23	4.6	0.69	1.1	24.7%
MAYO 01 2520125	—	10/10 sw1716	B1 8/10	52	10.4	1.01	4.72	45%
JUNIO 01 2520172	—	10/10 sw1423	3B1,1B3 4/10	29	5.8	0.27	7.56	130%
JULIO 01 2520255	—	10/10 sw1422	6B1,3B2,1B3 10/10	166	33.2	1.12	39.65	119%
AGOSTO 01 2520316	8/10 pH 7	10/10 sw1423	7B1,3B2 10/10	28	5.6	0.071	5.54	99%
SEPTIEMBRE 01 2520344	10/10 pH 6	10/10 sw1424	2B1,8B2 10/10	26	5.2	0.076	11.62	223.5%
OCTUBRE 01 2520372	4/10 pH 7	10/10 sw1423	B3+++ 10/10	112	22.4	0.223	31.18	139%
NOVIEMBRE 01 2520397	—	10/10 sw1422	—	109	21.8	0.08	22.45	103%
DICIEMBRE 01 2520397	7/10 pH 7	10/10 sw1421	—	58	11.6	0.034	24.82	214%
ENERO 02 2620043	—	10/10 sw1738	B1 1/10	120	24	0.033	48.71	203%
FEBRERO 02 2620044	—	10/10 sw1449	—	⊕ 18	⊕ 3.6	0.722	1.94	54%

NOTA: Los tubos en los que el medio está envasado son de vidrio de 20X125 marca PYREX en los meses de Marzo lote 2520083 y en Mayo lote 2520125, los demás lotes son de marca KIMAX, tienen tapa de rosca de baquelita y un volumen aproximado de 7 mL de medio.

- ✓ En el mes de Octubre en el parámetro burbujas se presenta (+++) para indicar que el medio estaba poroso en los 10 tubos.
- ✓ ⊕ En el mes de Febrero lote 2620044 un tubo de 10 presentó en la parte superior del medio (en el plano inclinado) una costra pegajosa amarilla, que a las 24 h de incubación mostró el tubo contaminado.
- ✓ Se observó que en los 13 diferentes lotes la pared libre de los tubos estaba empañada.

**CARACTERÍSTICAS FÍSICAS PREVIAS A LA INOCULACIÓN Y  
RESULTADOS DE LA PROMOCIÓN DEL DESARROLLO DEL MEDIO  
L-J CASA COMERCIAL "D"**

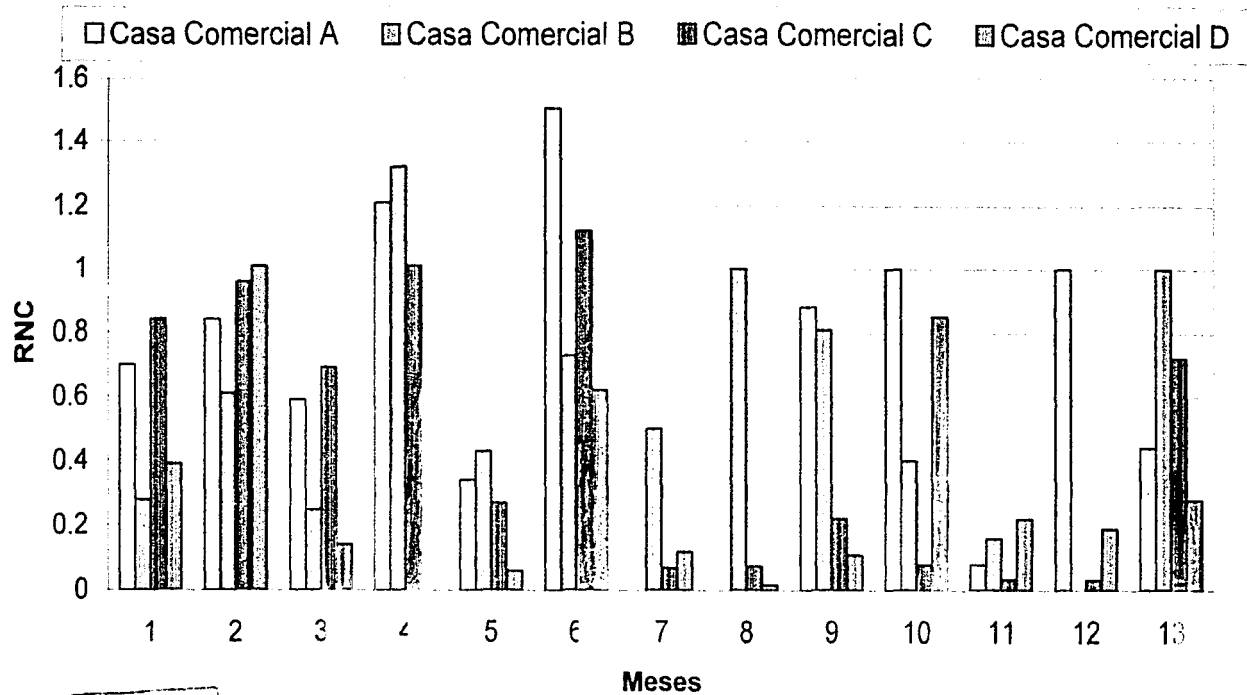
**TABLA 5**

IDENTIFICACIÓN DEL LOTE	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE L-J			NUM. TOTAL DE COLONIAS A LA 5ª SEM. DILUCIÓN 10 <sup>-3</sup>	MEDIA DE LOS 5 TUBOS ENSAYADOS	RNC	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)	COEFICIENTE DE VARIACION (CV)
	AGUA DE CONDEN. pH	COLOR	BURBUJAS					
FEB 01 15L30007	9/10 pH 7	9/10sw1736 1/10sw1449	—	28	5.6	0.39	5.3	94.6%
MARZO 01 31B3001	1/10 pH 7	10/10 sw1736	BI 2/10	87	17.4	1.01	7.5	43%
ABRIL 01 01B30012	10/10 pH 7	10/10 sw1736	BI 1/10	201	40.2	0.14	50.3	125%
MAYO 01 07C30012	10/10 pH 7	10/10 sw1736	BI 1/10	0	0	0	0	0
JUNIO 01 19D30013	4/10 pH 8	9/10sw1740 1/10sw1736	—	210	42	0.061	36.42	86.7%
JULIO 01 05F30011	—	10/10 sw1736	—	53	10.6	0.62	4.82	45%
AGOSTO 01 20F30012	10/10 pH 7	10/10 sw1740	—	39	7.8	0.12	9.06	116%
SEPTIEMBRE 01 29H30014	7/10 pH 7	10/10 sw1740	BI 5/10	57	11.4	0.017	21.7	191%
OCTUBRE 01 12J30014	10/10 pH 7	10/10 sw1740	BI 1/10	135	27	0.11	28.8	107%
ENERO 02 23H30013	—	10/10 sw1736↑	BI 2/10	7	1.4	0.857	1.34	96%
ENERO 02 24K30016	—	10/10 sw1736	—	9	1.8	0.22	3.49	194%
FEBRERO 02 09A30022	8/10 pH 7	10/10 sw1736	BI 2/10	51	10.2	0.196	14.54	143%
FEBRERO 02 27B30022	—	10/10 sw1717	—	25	5	0.28	2.121	42%

NOTA: Los tubos de este proveedor son de vidrio de 20X115, con tapa de rosca de baquelita y 7 mL de medio expresado en el marbete.

✓ El volumen del medio en los 13 lotes diferentes abarca toda la longitud del tubo.

## Relación del Número de Colonias de los 4 Diferentes Lotes

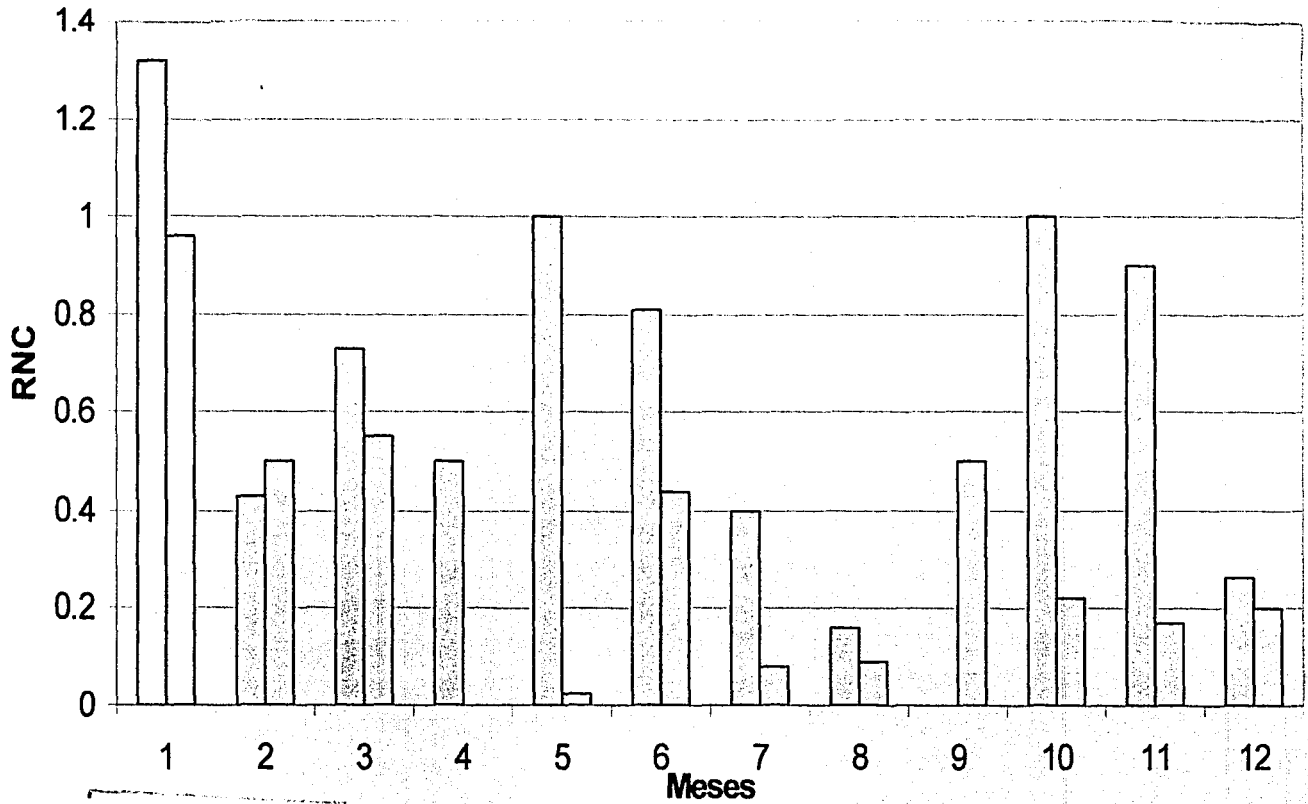


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# RNC del lote de Caducidad

□ Casa Comercial B

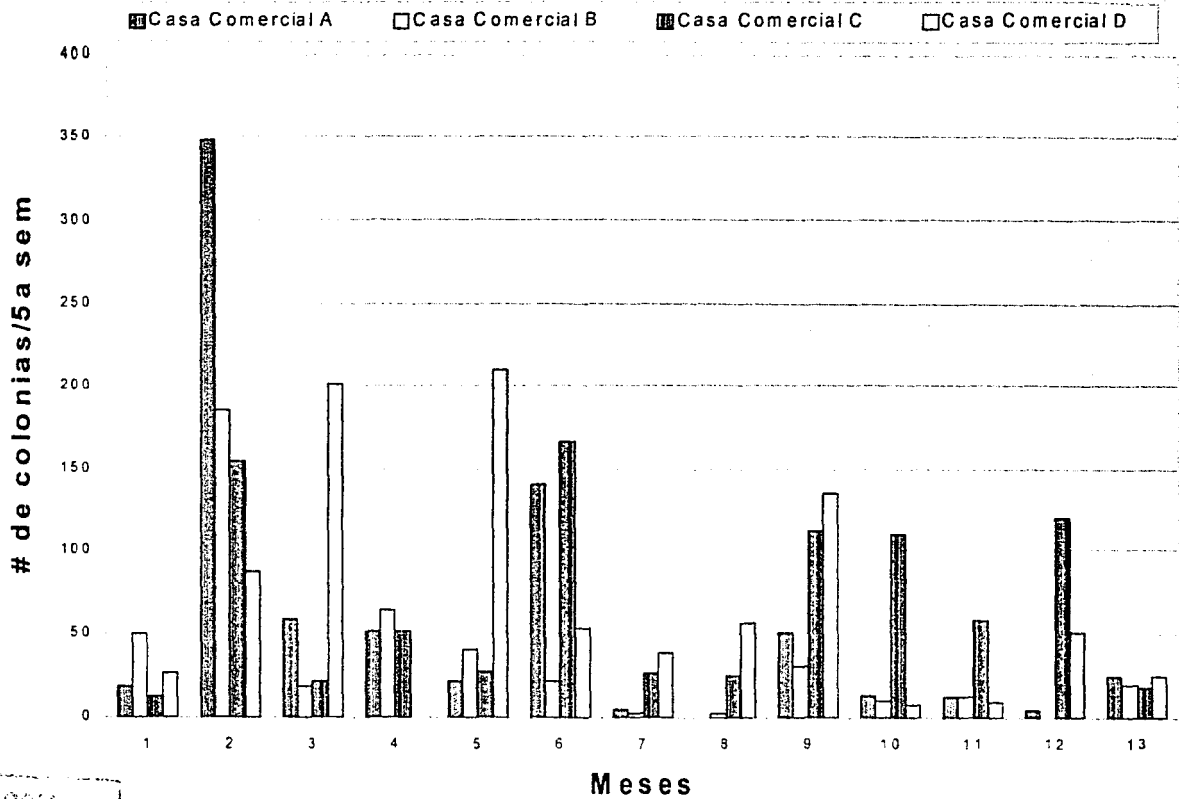
□ Casa Comercial B Cad.



TESE CON  
FALLA DE ORIGEN

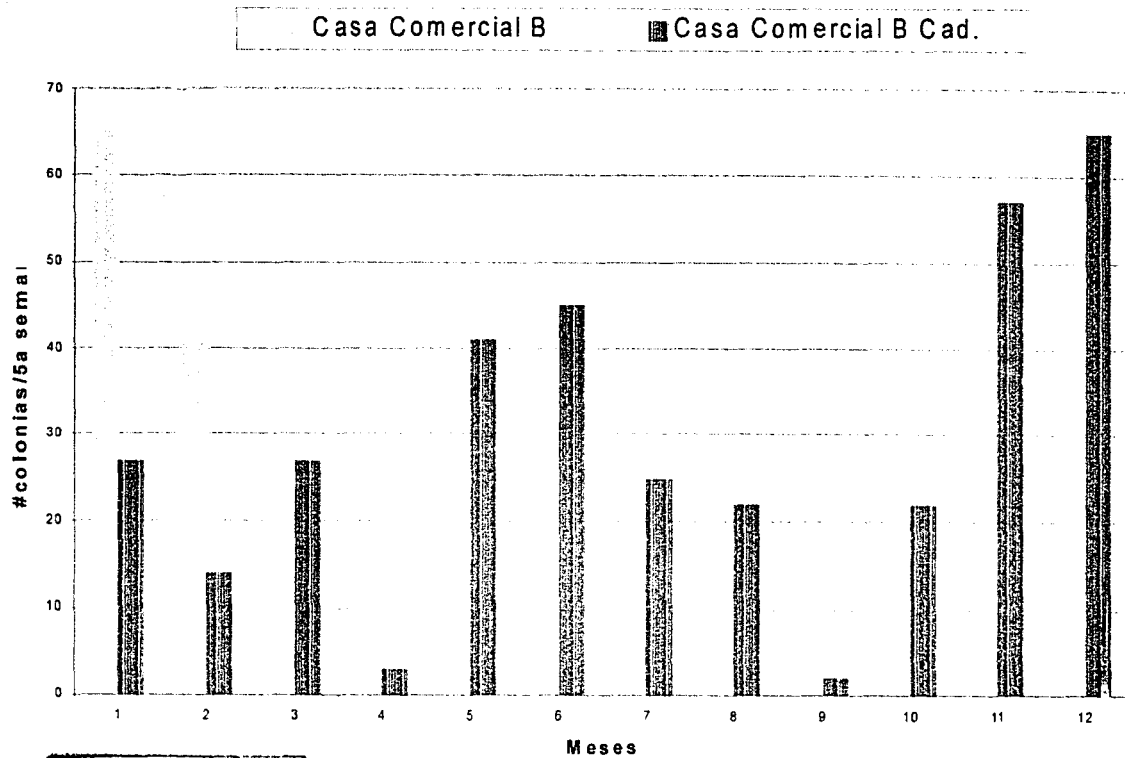


## Número Total de Colonias de los 4 Diferentes Lotes



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Número Total de Colonias Lote de Caducidad



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

☼ RELACIÓN DEL NÚMERO DE COLONIAS EN EL TRANCURSO DEL AÑO PARA LAS 4 CASAS COMERCIALES:

Se realizó la cuenta viable con el inóculo estándar en los 12 meses en L-J de 4 diferentes orígenes, y los resultados se expresan en relación del número de colonias (RNC) como se presenta en la Tabla 6.

INDICADORES DE CRECIMIENTO DE LOS LOTES DE MEDIO L-J DE LOS 4 DIFERENTES PROVEEDORES A LO LARGO DE 12 MESES

TABLA 6

MES	ORIGEN			
	A	B	C	D
FEB 01	0.70	0.28	0.84	0.39
MARZO 01	0.84	0.61	0.96	1.01
ABRIL 01	0.59	0.25	0.69	0.14
MAYO 01	1.21	1.32	1.01	0
JUNIO 01	0.34	0.43	0.27	0.061
JULIO 01	1.50	0.73	1.12	0.62
AGST 01	0	0.5	0.071	0.12
SEPT 01	0	1	0.076	0.017
OCT 01	0.88	0.81	0.22	0.11
NOV 01	1	0.40	0.08	-----
DIC 01	0.08	0.16	0.034	-----
ENERO 02	1	0	0.033	0.857
				0.222
FEB 02	0.44	1	0.72	0.196
				0.28
*TOTAL	6/13	4/13	4/13	2/13

La relación del número de colonias (RNC) para considerar aceptable a un medio es  $\geq 0.8$ . Cuando éste es mayor que la unidad significa que las colonias se hicieron confluentes a la 5ª semana.

La columna \*TOTAL expresa en el denominador el número total de ensayos y en el numerador el número de ensayos con  $RNC \geq 0.8$

DISEÑO ESTADÍSTICO: ANDEVA de un factor en el diseño completamente aleatorio:  $\alpha = 5\%$ ,  $F_{0.95,3,48} = 2.84$ ,  $F_{CAL} = 1.8140$ ,  $H_0 =$  todas las  $\mu$  son iguales,  $H_a =$  no todas las  $\mu$  son iguales.

Decisión:  $H_0$  no se rechaza, por lo tanto no existe una diferencia significativa en el RNC entre las 4 diferentes Casas Comerciales.

⊛ EFECTO DE CONSERVACIÓN DEL MEDIO L-J DE CASA COMERCIAL B EXPRESADO EN RELACIÓN DEL NÚMERO DE COLONIAS:

El efecto de la conservación en un periodo de 12 meses de un lote de medio L-J se concentra en la tabla 7. Los medios empleados son del mismo proveedor, la diferencia es que el medio B caducidad tiene tiempos de refrigeración iguales al número de ensayos, esto es, para Mayo tenía un mes de conservado, para Junio 2 meses, y así sucesivamente, hasta llegar a 12.

El análisis estadístico indica que existe diferencia significativa en el promedio de RNC de ambos medios.

TIEMPO DE CONSERVACIÓN  
PROVEEDOR B vs PROVEEDOR B CADUCIDAD  
TABLA 7

RELACION DEL NÚMERO DE COLONIAS (RNC)	MES	ORIGEN		
		A	B	B CADUCIDAD
	ABRIL 01	0.59	0.25	0.25
	MAYO 01	1.21	1.32	0.96
	JUNIO 01	0.34	0.43	0.5
	JULIO 01	1.50	0.73	0.55
	AGST 01	0	0.5	0
	SEPT 01	0	1	0.024
	OCT 01	0.88	0.81	0.44
	NOV 01	1	0.4	0.08
	DIC 01	0.08	0.16	0.09
	ENERO 02	1	0	0.5
	FEB 02	0.44	1	0.227
	MARZO 02	0.47	0.909	0.175
	ABRIL 02	0.8	0.268	0.2
	CV	74%	63%	91%
	MEDIA	0.639	0.627	0.312
	LOTES CON RNC ACEPTABLE	6/12	5/12	1/12

DISEÑO ESTADÍSTICO: Prueba de hipótesis acerca de la diferencia de 2 medias con  $\sigma_1$  y  $\sigma_2$  desconocidas y diferentes:  $\alpha = 5\%$ ,  $n_1$  y  $n_2 = 12$ ,  $s_1 = 0.3964$  y  $s_2 = 0.2837$ ,  $t_c = 2.24$ ,  $t_{0.95,22} = 1.7171$ ,  $H_0 = \mu_1 - \mu_2 \leq 0$ ,  $H_a = \mu_1 - \mu_2 > 0$ .

Decisión:  $H_0$  se rechaza, con  $\alpha = 5\%$ , por lo tanto el promedio del RNC de B es significativamente mayor que el promedio de RNC de B Caducidad.

## DISCUSIÓN

### ☉ ESTANDARIZACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE *M. tuberculosis*:

La promoción del desarrollo obtenida para los lotes de cada proveedor, dependió de la "suspensión madre", que debe ser lo más homogénea posible, para esto su estandarización.

1. Sin embargo, la naturaleza hidrofóbica de la bacteria es un obstáculo para obtener suspensiones con un grado de dispersión aceptable.

La formación del congegado es debido a la característica propia de las micobacterias: su alto contenido lipídico de hasta un 60% del peso seco de la célula, que le imparte el carácter hidrófobo<sup>14,16</sup>. Para evitar este inconveniente se puede emplear Tween (agente tensoactivo), que propicia el crecimiento en forma dispersa, aunque sin llegar a separarlas en células aisladas<sup>16</sup>. En la metodología empleada no se utilizó Tween debido a que se ajustó al método ya descrito (en Material y Métodos)<sup>22</sup>.

2. La metodología empleada para la preparación del inóculo fue de acuerdo al método de las proporciones de Cannetti (método definitivo), que permite disminuir los agregados bacilares y trabajar con la parte más fina, esto es, el sobrenadante.

3. Los 2 primeros intentos demostraron que la comparación visual no es suficiente para tener una suspensión homogénea, y la comparación con el espectrofotómetro permite ajustar a un rango la suspensión, aún así, se necesita adquirir una basta habilidad para prepararla, debido a que el grado de agregación de los bacilos es mayor cuando se obtienen de las colonias de un medio sólido que de aquel que es líquido.

4. La eficiencia de la dispersión bacilar se comprobó por microscopía, en donde se verificó la presencia de bacilos individuales y la cantidad y tamaño de los agregados bacilares.

Con ésto se esperaba obtener un crecimiento similar en el mismo ensayo, esto es, en el mismo mes tener Relación del Número de Colonias (RNC) semejantes en los 4 diferentes lotes, Tabla 6, lo cual no ocurre siempre, debido quizá, a defectos metodológicos o a la misma dispersión bacilar, ya que no tiene a las micobacterias completamente disgregadas, sino que forman grumos difíciles de separar, tal congregado celular al inocularse en un tubo con medio L-J permite un desarrollo mayor que en aquel en donde no hay células o su cantidad es menor, así pueden pasar hasta 6 semanas antes de observar un crecimiento visible después de un inóculo pequeño<sup>14</sup>.

5. La turbidez de la suspensión madre puede corresponder a medio de cultivo transferido al momento de tomar la masa bacilar, por tal razón, la presencia de la bacteria se conoció por su viabilidad mediante el empleo del BACTEC 460 TB y la verificación microscópica.

Así al observar la gráfica 1 se ve que la turbidez corresponde a los bacilos, pues el crecimiento bacteriano se refleja por la duplicación de un día a otro, que es el comportamiento esperado. En ambas curvas se observa esa duplicación, no obstante, la curva que corresponde al mes de Septiembre al 6° día llega al máximo de su desarrollo, mientras que la del mes de Octubre al 8° día lleva la mitad del crecimiento.

Esto puede ser debido a 2 situaciones:

- a. Un defecto de incubación, esto es, que la temperatura del cuarto estufa en el período de incubación de Septiembre a Octubre no sea el adecuado para el desarrollo (fluctuaciones de temperatura de más de 1°C)
- b. El inóculo era pequeño en el mes de Octubre, tanto que se requiere de mayor tiempo para alcanzar un GI comparable al mes de Septiembre en el 6° día.

## ☉ DILUCIONES SERIADAS

Las diluciones realizadas cada semana tenían una doble función:

La primera: habilitar al operador en la técnica de la preparación de la suspensión.

La segunda: tener un control sobre el trabajo realizado.

Teóricamente las diluciones empleadas estaban calculadas para obtener un número determinado y proporcional de colonias en cada tubo (Tabla A), colonias contables en una superficie pequeña. A pesar de esto, y por las características de la bacteria la suspensión madre no era lo suficientemente homogénea, y si a esto se le añade el congregado entre ellas entonces se puede explicar los resultados de la Tabla B, en donde lo destacable es que la proporción de duplicado en cada dilución se mantiene. Con esto se sabe que la persona que lo realiza adquiere destreza y que el trabajo está realizado como debe de ser.

Aún así, como es una metodología que a través del tiempo se domina, se puede observar que un inadecuado manejo de ésta (dispersión bacilar, dilución, características de la bacteria) no permite evaluar correctamente la Calidad de los medios, tal es el ejemplo del proveedor B en el mes de Enero, Tabla 6, en donde se puede observar que presenta un RNC de cero, mientras que los otros proveedores presentan valores de 1, 0.033, 0.857, 0.222, que corresponden a la casa comercial A, C y D con sus 2 lotes, respectivamente. La razón del cero es porque los 5 tubos que se emplearon en la dilución  $10^{-5}$  no desarrollaron colonias en las 5 semanas de incubación, sin embargo en la dilución  $10^{-4}$  si hubo desarrollo. Esto puede ser por la razón ya explicada anteriormente, en donde se espera que en la dilución  $10^{-4}$  se tengan 10 veces más colonias que en  $10^{-5}$ , por ejemplo, si el desarrollo en la dilución  $10^{-4}$  es de 2 colonias entonces se espera que no exista desarrollo en la otra dilución.

En otras palabras, esto significa que la cantidad de bacilos contenida en la suspensión madre varía entre un millón hasta cien millones de bacterias. Por ejemplo, si la suspensión madre contiene cien millones de microorganismos por mililitro, la suspensión  $10^{-3}$ , que ha sido diluida mil veces, contiene sólo cien mil microorganismos, así como la siembra se realiza con la quinta parte de un mL (0.2 mL), se desarrollarán aproximadamente veinte mil colonias, imposibles de contar. Por lo tanto en la suspensión  $10^{-5}$  que ha sido diluida cien mil veces más que la suspensión madre, contiene mil microorganismos por mL y al sembrarse la quinta parte

(0.2 mL), se desarrollarán doscientas colonias que son más fáciles de contar.

Si la suspensión madre contiene sólo un millón de bacilos por mL, la siembra de 0.2 mL de la suspensión de  $10^{-5}$  dará origen a sólo 2 colonias, mientras que la siembra de 0.2 mL de la suspensión  $10^{-3}$  dará un desarrollo de doscientas colonias.<sup>22</sup>

#### ✿ CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS 4 DIFERENTES MEDIOS:

La apreciación de las características físicas es elemental, por no requerir más que del entrenamiento del usuario, pero existe el inconveniente de una baja correlación entre éstas y la utilidad del medio.

La calidad del medio, se manifiesta en la capacidad de recuperación de las bacterias, y es dependiente de factores que van desde la calidad de la materia prima y el proceso de preparación hasta la conservación del producto terminado. Esto es importante porque puede obtenerse un medio L-J con:

- a) características indeseables, pero presentar un RNC, y
- b) lo contrario, un aspecto impecable pero no hay recuperación.

En el inciso (a) se ubica el proveedor C, Tabla 4, en donde del mes de Junio a Diciembre el medio presentó tonalidades desfavorables (desde sw1421 hasta sw1424), tonos muy pálidos con apariencia blanquecina (y aparentemente pH alcalino), además presentaban una gran cantidad de burbujas hasta el punto donde la superficie se torno porosa (Octubre), después de 48h de incubación el tono de los tubos cambiaba (sw1449 o sw1717). Estos cambios fueron muy evidentes y en el mes de Noviembre personal de dicha Casa Comercial intercambio sus impresiones y posteriormente notificó que la base que utilizaban para preparar el medio L-J era industrializada y estaba caduca, corrigieron esto y los medios empleados después de Diciembre tenían mejor presentación. Sin embargo, presenta un RNC bajo en estos meses, atribuido a dicha razón.

Para el inciso (b) el ejemplo más representativo es el medio del proveedor D (Tabla 5), en donde el medio tiene una presentación visualmente aceptable, pero los 10 tubos en el mes de Mayo no presentaron desarrollo alguno al término de las 5 semanas, después del tiempo de



evaluación los 10 tubos se incubaron por 3 semanas más y ninguno desarrollo colonias, al término de este tiempo a 2 tubos (de diferente dilución) se les realizó reacción de nitratos y ambos resultaron positivos, lo que indica la presencia de bacterias viables, y la incapacidad del medio para poder detectar a la bacteria.

Las características físicas observadas para los distintos tubos fueron pH, color , burbujas y contaminación:

➤ **El pH:**

indica si el medio tiene pH idóneo para fomentar el desarrollo de la bacteria, pues debe ser de un valor aproximado entre 6.7 y 6.9, valores que son óptimos para su crecimiento<sup>23</sup>, esta característica es visible por el cambio de tono del medio, si existe alcalinidad el medio se torna blanco, cosa que suele suceder cuando el tubo no es correctamente lavado y se encuentra alcalinizado por las soluciones detergentes que se emplearon para lavarse; si el medio llega a estar contaminado con otro microorganismo diferente al género Mycobacterium se torna verde muy intenso casi azul, porque el medio está ácido.<sup>23</sup>

Así, la Casa Comercial B lote MLJ-321 mes Abril 02 es pH=6 (Tabla 2), lo que afecta al RNC (0.268) ya que desciende 0.6 unidades al compararlo con el proveedor A(RNC 0.8) en el mismo mes (Tabla 7), lo cual significa que tarda la bacteria en adaptarse al medio y poder desarrollarse. Aún así, se esperaría que el tono fuera más elevado que sw1737, con lo cual no se puede decir que existe una relación directa entre pH y color del medio, ya que en el mes de Marzo 01 presenta la misma tonalidad con un pH de 7.

Para el mismo proveedor, pero con el lote de caducidad (Tabla 3), el pH=8 en los meses de Agosto 01, Noviembre 01 y Abril 02, la tonalidad del medio en dichos meses es constante e incluso un poco más elevada que sw1736 en el mes de Noviembre 01, color que se esperaría más pálido. En cuanto al RNC no existe mucha variación comparándolo con los otros medios en los mismos meses (Tabla 3 y 6), por lo cual una parte del descenso de dicho valor no puede

atribuirse del todo al pH del medio, es importante tomar en cuenta todos los factores.

En cuanto al proveedor C, anteriormente en el inciso a) se hizo mención de la tonalidad del medio, el cual debería de ser blanquecino o muy pálido, cosa que sucedió solamente en el mes de Septiembre 01, pero aún así el pH es de 6 y no corresponde al tono observado, esto es debido a la razón ya mencionada.

Al proveedor D en el mes de Junio 01 le ocurre la misma disparidad en cuanto a tono y pH, ya que este último es de 8 y el color es más elevado de lo normal (sw1740) Tabla 5, con lo que su RNC si se ve afectado (0.061), debido a que de todos los lotes es el que recupera más tardíamente (Tabla 6).

#### > Las burbujas:

en el medio no son deseables porque disminuyen la visibilidad del crecimiento y en dado momento absorben el inóculo evitando el crecimiento en la superficie, éstas pueden tener su origen en la agitación de los huevos al preparar el homogenizado y envasarse, así ese aire atrapado se dilata con el calentamiento al momento de coagularse o también se forman por sobrecalentamiento del medio. Si es por la primera forma se evitan aplicando vacío por 15 min. al medio antes de envasarlo. Si es por la segunda, se debe controlar el tiempo y temperatura de coagulación (85° y 50 min, tiempo y temperatura máximos<sup>23</sup>), debido a que este descuido disminuye la posibilidad de desarrollo. Además las burbujas son indeseables porque si el medio es poroso se seca con mayor facilidad.

Un ejemplo de esta característica inconveniente es el proveedor C, Tabla 4, que en el mes de Junio 01 a Octubre 01 presenta un medio con más de 20 burbujas, hasta el punto de verse poroso (Octubre 01), esto aunado a las otras características ocasionó que su RNC en los meses de Agosto, Septiembre y Octubre fuera muy bajo (0.071, 0.076 y 0.223 respectivamente), al compararlo con los otros proveedores (Tabla 6).

➤ **El color:**

es una característica que guía al usuario para emplear el medio, ya que el colorante verde de malaquita le confiere la propiedad de inhibir el crecimiento de contaminantes, lo que lo hace selectivo; si la concentración de colorante es demasiado alta también puede inhibir el crecimiento de las micobacterias junto con el de las bacterias contaminantes<sup>15</sup>, en el caso del proveedor D, Tabla 5, se atribuye su color a la concentración del colorante, porque siempre presentó un tono muy intenso (sw1736 y sw1740), que al compararlo con los otros medios tenía apariencia de acidificado, lo cual modificó su RNC a tal grado de que no presente crecimiento bacteriano como en el mes de Mayo. Los tonos extremos (muy pálidos) ya fueron mencionados y explicados en el inciso (a) al iniciar el párrafo de “Características físicas de los 4 diferentes medios”.

El color varía debido al **huevo empleado**, ya que el tono final del medio depende de la yema. Por lo mismo es poco útil para valorar la calidad del medio, y únicamente es válida cuando se conoce y es constante la calidad del huevo, esto sucede cuando se sabe que a los animales se les da una dieta “estándar” libre de  $\beta$  carotenos, con lo que las fluctuaciones de color serían más moderadas.

La diferencia de tono entre un mismo lote ( tabla 1,2,3 y 5) puede ser debida a el tiempo de espera que tuvieron los tubos al momento de meterlos al coagulador, esto es, el tiempo que transcurrió desde el envasado hasta coagularlos, debido a que el tono verde de la mezcla del verde de malaquita con el homogenizado del huevo disminuye conforme pasa el tiempo (palidece).

➤ **La contaminación de los medios de cultivo puede tener 2 orígenes:**

- a) Por efecto del desempeño del usuario en el momento del ensayo, como en el caso del proveedor A en el mes de Febrero 02, en donde un tubo de 20 a las 48 h de inoculado resultó con esta característica (Tabla 1)
- b) Origen del medio, esto es, en la preparación misma, situación que se demuestra con la prueba de esterilidad,

que permite la liberación por el fabricante del producto terminado. En el mismo mes de Febrero 02 para el proveedor C (Tabla 4), un tubo de 10 presentó una costra pegajosa amarilla en la parte superior del medio, éste se incubó a 37°C y a las 24 h el tubo mostró contaminación.

■ Para el proveedor B (tabla 2), en cuanto a las características propias del medio, éste a lo largo de los 15 ensayos presenta el inconveniente de que la tapa no ajusta bien al tubo y en otras ocasiones la parte superior de la misma tapa parece que se va a desprender. Sin embargo esto no afectó el medio ni en cuanto a desecación ni a contaminación.

■ El proveedor C ( tabla 4) presenta un medio que en los 13 lotes diferentes la pared libre del tubo estaba empañada, lo cual impide la visibilidad al momento de la cuenta del desarrollo, esto puede ser debido a que los tubos son movidos cuando se están coagulando.

■ Para el proveedor D ( Tabla 5), la distribución del medio en los tubos en los 13 lotes diferentes abarcan toda la longitud del tubo, cuando se recomienda que queden por lo menos 3 cm entre la boca del tubo y el extremo del plano inclinado del medio coagulado<sup>23</sup>. Con esta característica del medio, aumenta el riesgo de contaminación tanto para el medio como para la persona que lo manipula. Además el inóculo puede quedar en la parte del plano inclinado, que es la primera en deshidratarse, y con más facilidad cuando queda una capa delgada.

## ❖ RELACIÓN DEL NÚMERO DE COLONIAS (RNC)

El valor del RNC indica la apreciación de las colonias en un medio L-J a partir de la 3ª semana de incubación hasta la 5ª semana y puede ir desde cero hasta uno, o incluso mayor de uno, cuando existe confluencia de las colonias. Por lo tanto un valor de cero es ambiguo, porque dicho valor puede reflejar la ausencia de bacterias a la 3ª semana hasta la 8ª, o bien es debido a un desarrollo tardío, el cual se manifiesta a partir de la 4ª semana en adelante.

Así para el lote A en el mes de Agosto, Tabla 6, el cero indica desarrollo tardío, pues existen colonias a las 5 semanas de incubado (Tabla 1, mismo mes), no así para el mes de Septiembre, donde existe una descompensación, manifiesta en los valores de RNC en los 4 lotes (tabla 6), donde el proveedor A tiene cero, B = 1, B Caducidad = 0.024, C = 0.076 y D = 0.017. El valor de cero del proveedor A es contrario al primero: por ausencia de bacterias, mientras que el 1 del proveedor B indica que existía a la 3ª semana desarrollo y de igual forma a la 5ª semana, este número refleja la presencia de una colonia en 2 tubos (Tabla 2, mes Septiembre 01), por lo que la media para los 5 tubos es de 0.4 colonias. Los valores de los otros proveedores son bajos porque el desarrollo es tardío y muy pobre. Tabla 1,2,3,4 y 5 en el mes de Septiembre.

En general para todos los cultivos, esta descompensación es debida a la temperatura del cuarto estufa en el periodo de incubación de este mes que fluctuó entre 37° y 55° C lo que de alguna forma afectó el desarrollo de la bacteria, tomando en cuenta que la temperatura de incubación para el desarrollo óptimo es de 37° C y crece mal o no se desarrolla a 30° C o de 42° a 45° C<sup>15</sup>.

Esta variación no se pudo controlar debido a que el cuarto de incubación registro dichas temperaturas en fines de semana; este desajuste fue comprobado porque en ensayos semanales realizados en el mismo mes de Sep., pero fecha (11 Sept 01) diferente al ensayo mensual, en los inóculos de  $0.2 \times 10^{-4}$  y de  $0.5 \times 10^{-5}$  al llegar a la 5ª semana de incubación no existía desarrollo alguno, posteriormente se continuaron incubando 2 tubos y se presentó desarrollo hasta las 12 semanas:  $0.2 \times 10^{-4} = 8$  colonias y en  $0.5 \times 10^{-5} = 14$  colonias, en ambos hubo desarrollo en el agua de condensación, y el número de colonias está invertido, probablemente por errores en la metodología o por la dispersión bacilar; con esto se descarta la posibilidad de que el medio no tenía la capacidad para detectar a la bacteria.

Este comportamiento responde a un periodo de latencia muy prolongado de la bacteria, en el cual por condiciones ambientales desfavorables (pH, temperatura, nutrientes, etc.) restringe su multiplicación para conservarse viva<sup>12,14</sup>.

El ensayo de promoción del desarrollo es una buena prueba para verificar la utilidad del medio L-J, pero existen factores como la metodología, el ambiente, la experiencia de la persona que lo manipula, entre otros, que influyen en su resultado. Por tal razón debe realizarse en un laboratorio de tercer nivel, en donde se disminuyan dichos factores al mínimo para realizar una evaluación correcta y obtener resultados lo más cercanos a la realidad.

Todas estas observaciones deben ser consideradas cuando el medio es empleado para el aislamiento de bacilos en muestras clínicas, porque dependiendo del origen de la muestra es la cantidad de bacilos presentes, así un LCR, o un tracto genitourinario posee una menor cantidad de bacilos que un esputo. En consecuencia, los bacilos que se desarrollan en el medio L-J para el control de Calidad están acostumbrados al proceso de manipulación constante (H37Rv, cepa de referencia), no así los bacilos obtenidos de dichas muestras clínicas, que son pasados por procesos descontaminantes (muestras de esputo y orina), con lo cual se afecta su viabilidad o su proceso de adaptación al medio, tomando en cuenta que el inóculo que se emplea para el control de Calidad es una dilución  $10^{-5}$ , de la que se espera obtener 60 colonias (tabla A); por lo tanto si el medio no tiene la capacidad de recuperar esta cantidad de bacterias, no tendrá opción para las muestras clínicas.

## ☼ EFECTO DE LA CONSERVACIÓN

Esto es importante porque el tiempo de conservación en el medio L-J es una controversia debido a que se manejan diferentes tiempos, el criterio técnico indica: "no se emplee el medio después de 2 meses desde su preparación"<sup>23</sup>; "su duración es de un mes a partir de la fecha de su preparación, si se mantiene en refrigeración entre 4° y 8° C"<sup>22</sup>. En la práctica los proveedores manifiestan en sus marbetes tiempos que fluctúan desde los 4 meses (proveedor C) hasta un año (proveedor B y D).

A lo largo del año, de Abril 01 a Abril 02, el medio B de Caducidad se evaluó comparándolo con su RNC inicial hasta el correspondiente al del último mes (Tabla 7). El RNC inicial que corresponde al mes de Abril 01 es de 0.25, al mes de que se preparó el RNC es de 0.96, mes de Mayo, y al compararlo con los otros meses el RNC muestra irregularidades, que se pueden deber a la misma dispersión bacilar.

Al 4° mes de preparado, Agosto (Tabla 7) su capacidad de recuperación disminuyó hasta cero debido a que a la 3ª semana no había desarrollo, si no que fue posterior a este tiempo, con lo que se comprueba lo reportado en la literatura.

El RNC de Abril 02, mes 12 de caducidad, es de 0.2; parece que no disminuyó significativamente, no obstante, existen durante el año valores extremos que reflejan su incapacidad de recuperar tempranamente a la bacteria, hasta en un 91%, ya que el total de meses en donde existe  $\geq 0.8$  es de 1/12.

Cuando a un producto que está a la venta se le asigna un periodo de caducidad de tiempo indefinido, el personal administrativo encargado de compras piensa que es "un producto tan bueno" que toda la vida es útil, lo que representa un ahorro, sin embargo en productos que están relacionados con insumos para la salud, especialmente material para diagnóstico, esto es una aberración, debido a que son productos que contienen algún ingrediente biológico que con el paso del tiempo se deteriora y pierde sus características que lo hacían "tan bueno". Esta es la razón por la cual a un medio de cultivo como L-J se le asigna un periodo de caducidad de un año, representa "ahorro" y deja en tela de juicio la ignorancia del personal administrativo que realiza la compra. En este caso la fecha de caducidad es cuestión de costos.

## CONCLUSIONES

◆ En general, de acuerdo al número de colonias esperado las cuentas fueron bajas, con una diferencia no significativa entre cada uno de los lotes, pero al analizar el total de ensayos (A= 6/13, B= 4/13, C= 4/13 y D= 2/13) se observa que existen diferencias entre los lotes de los distintos proveedores.

◆ La preparación del inóculo a partir de la suspensión madre, de acuerdo a la metodología de Cannetti, estandarizado por nefelometría permitió obtener una suspensión homogénea, esto requiere de práctica para disminuir el tamaño de partícula (congregado bacilar).

◆ Las características físicas del medio L-J como el color, pH, burbujas y contaminación, así como los procesos que las establecen, son factores determinantes que de cierta forma afectan la cuenta viable.

◆ La conservación de un medio L-J en refrigeración (4 a 8°C) por un período de un año, disminuye la capacidad de aislamiento, así de los 12 ensayos realizados 5/12 de lotes nuevos, del mes, tienen una recuperación satisfactoria, mientras que del medio refrigerado únicamente 1/12 recupera favorablemente.



## RECOMENDACIONES

---

1. Sistematizar el Control de Calidad del medio L-J en el programa de Garantía de Calidad del usuario.
2. Incluir en el programa de control de Calidad del Laboratorio de Referencia a los medios de cultivo de los productores comerciales.
3. Incluir los resultados del Control de Calidad obtenidos por el laboratorio control del fabricante en el marbete de cada lote, según la norma y por periodo ajustado al criterio técnico de expertos.
4. Verificar la metodología, materias primas y equipo cuando se elabore medio de cultivo.
5. Realizar el aislamiento de muestras en 2 medios de cultivo para garantizar la recuperación, un medio líquido y uno sólido, por lo tanto, el Control de Calidad del medio L-J debe Normarse.

# ANEXOS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANEXO I

### COMPROBACIÓN DE *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294

#### \* TINCIÓN DE ZIEHL-NEELEN: <sup>22,30</sup>

REACTIVOS:	Fucsina básica	3g	}	A
	Etanol 95%	100mL		
	Fenol en cristales	5g		
	Agua destilada	100mL		
	HCl concentrado	30mL	}	B
	Etanol 95%	970mL		
	Azul de metileno	1g	}	C
	Etanol 95%	100mL		

#### PREPARACIÓN:

- Fucsina fenicada: 1.- disolver la fucsina básica en el etanol  
2.- disolver los cristales de fenol en el agua



carbol fucsina: mezclar solución 1 con 90mL de solución 2

- solución decolorante (alcohol-ácido): agregar cuidadosamente por las paredes del recipiente el HCl al etanol y mezclar con precaución
- azul de metileno: disolver por agitación el azul de metileno en el etanol y agregar agua destilada hasta completar 1000 mL

#### PROCEDIMIENTO:

- preparar el frotis y dejar secar al aire
- fijar al calor o con metanol absoluto
- cubrir el frotis con carbol fucsina y calentar hasta que salgan vapores, por 5 min. (evitar desecación)
- lavar la lámina con agua
- decolorar con alcohol-ácido por 2 min.
- lavar la lámina con agua y escurrir
- cubrir la lámina con azul de metileno por 2 min.
- enjuagar con agua, escurrir y secar al aire
- observar al microscopio con objetivo de inmersión

\* VIABILIDAD DE LOS BACIOS DE LA SUSPENSIÓN DE  
*M. tuberculosis* H37Rv DE TURBIDEZ COMPARABLE AL TUBO  
#1 DE McFARLAND<sup>31</sup>

MATERIAL: Viales de medio 12B

Jeringa de 1mL

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Realizar 2 diluciones 1:100 y 1:500 e inocular 0.1mL de cada una en los viales de 12B
- 2.- incubar los viales a 37°C y leer diariamente en el BACTEC 460 TB
- 3.- el índice de crecimiento debe ser el doble del día anterior y es positivo a partir de 10 hasta 999 unidades

\* REDUCCIÓN DE NITRATOS<sup>22</sup>

REACTIVOS: NITRATO DE SODIO M/100 EN  
AMORTIGUADOR DE FOSFATOS M/45 pH 7

NaNO<sub>3</sub> 0.085g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1175g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.485g

H<sub>2</sub>O 100ml

1.- HCl concentrado

2.- sulfanilamida al 0.2%

3.- clorhidrato de n-naftil-etilen-diamina al 0.1%

PROCEDIMIENTO:

- agregar 2mL de nitrato de sodio a los tubos que contienen medio y el inóculo de bacilos sin desarrollo de colonias, más 1 mL de fosfatos M/45
- incubar a 37° C por 2h
- colocar el líquido del tubo con medio en un tubo 13x100 y agregar 1 gota de 1 + 2 gotas de 2 + 2 gotas de 3
- el desarrollo de color rojo ( rosa a rojo) indica que la prueba es positiva y que existen bacilos viables en el tubo, pero el medio no tiene la capacidad de recuperarlos.

## ANEXO 2

### TRATAMIENTO DEL MATERIAL DE VIDRIO<sup>23</sup>

Para realizar el medio Löwenstein-Jensen se requiere que el material de vidrio sea lavado y enjuagado escrupulosamente antes de su esterilización, especialmente, los tubos donde se envasara el medio.

Los tubos deben ser de vidrio neutro:

esto se logra enjuagando los tubos ya limpios con una solución de HCl al 1% por 30 min., y posteriormente 2 veces con agua destilada.

La razón del vidrio neutro es porque los tubos que se lavan con soluciones detergentes que tienen una alta concentración de sosa se alcalinizan, y la alcalinidad influye desfavorablemente en la composición del medio, ya que éste adquiere un color blanco-amarillo en la parte que está en contacto con el tubo.

## ANEXO 3

### ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

ATCC: American Type Culture Collection. Colección internacional de cepas control, las cuales son seleccionadas por su estabilidad y por su utilidad en el método utilizado<sup>15,31</sup>

Bactec 460 TB: instrumento automatizado que detecta el crecimiento de las micobacterias por medio de ácido palmítico (como sustrato) marcado con <sup>14</sup>C e incluido en la base del medio líquido Middlebrook 7H9, también es denominado instrumento radiométrico por el empleo de material radioactivo<sup>31</sup>

BAAR: bacilo ácido alcohol resistente<sup>15</sup>

Calidad: todas las características de una entidad que sustentan su capacidad de satisfacer necesidades expresas e implícitas<sup>24</sup>

Control de calidad: técnicas operativas y actividades necesarias para cumplir con los requisitos de calidad y concierne el monitoreo diario de los procedimientos realizados en el laboratorio<sup>24</sup>

Cuenta Viable: número de colonias obtenidas por la promoción del desarrollo que refleja a las bacterias que tienen la capacidad de multiplicarse. Bacterias vivas que se observan por la formación de colonias

Entidad: incluye productos, actividades, procesos, organizaciones o personas<sup>24</sup>

Garantía de Calidad: incluye las acciones sistemáticas y planeadas implementadas en el laboratorio necesarias para crear suficiente confianza de que un producto o un servicio cumple con los requisitos necesarios de calidad<sup>24</sup>

GI: Growth Index. Escala de 0 a 999 unidades del BACTEC 460 TB con la que determina cuantitativamente el crecimiento micobacteriano, se considera positivo de 10 en adelante y debe ser el doble del día anterior<sup>31</sup>

L-J: medio Löwenstein-Jensen

Morbilidad: término genérico que expresa la frecuencia de las enfermedades en un período, en el total de habitantes (enfermos y sanos) entre los que se presentan esos padecimientos.<sup>35</sup>

Mortalidad: término genérico que expresa la frecuencia de defunciones en un período, en el total de habitantes (enfermos y sanos) entre las que se presentan esas defunciones, se expresa por mil.<sup>35</sup>

Promoción del Desarrollo: metodología que verifica el desarrollo bacteriano en un medio de cultivo determinado, por el empleo de diluciones seriadas.

RNC: relación entre el número de colonias hallado a la 3ª semana y a la 5ª semana en la dilución  $10^{-5}$ .<sup>27</sup>

TAES: Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado.<sup>1</sup>

## ANEXO 4

### COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE LAS 4 DIFERENTES CASAS COMERCIALES

#### ☞ CASA COMERCIAL A

Los reactivos y sus respectivas cantidades que contiene este medio, así como su preparación se encuentran en la página 32.

#### ☞ CASA COMERCIAL B

El marbete de cada lote indica que contiene:

Fórmula: gramos por 600 mL de agua destilada:

Asparagina-L	3.6
Citrato de Magnesio	0.6
Fécula de papa	30.0
Fosfato de potasio monobásico	2.5
Solución de huevos enteros homogenizados	1000.0 mL
Sulfato de magnesio	0.24
Verde de malaquita	0.4

Además, contiene la fecha de caducidad, el número de lote, la descripción de los tubos que contienen el medio (10 tubos por paquete) y el volumen del mismo (7mL), la forma de almacenarse y la dirección del lugar donde se elabora.



## ☞ CASA COMERCIAL C

El marbete es una caja rectangular que contiene como información para el consumidor el número de lote, fecha de elaboración y caducidad, el contenido (3 tubos con medio), la forma de almacenarse y la dirección del proveedor; además en el interior trae un instructivo con la descripción de la metodología del procesamiento de la muestra y siembra bacteriológica.

Los tubos empleados por este proveedor son de marca Pyrex o Kimax, y por comunicación directa con personal de dicha Casa Comercial, se sabe que el volumen del medio es 7 mL.

En cuanto a la formulación se comunicó que se empleaba para la elaboración del medio:

Base para medio L-J  
Huevo de pata

## ☞ CASA COMERCIAL D

El marbete es una caja con 10 tubos y contiene la siguiente información: volumen del medio (7 mL), el número de lote, la fecha de caducidad, la forma de almacenarse y la dirección del productor.

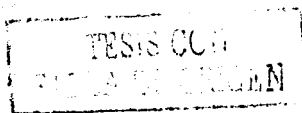
Los tubos con medio contienen un recubrimiento de plástico transparente en la tapa y abarca parte del tubo, como protección.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. 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, México, 31 de Octubre de 2000, Tomo DLXV, No. 22, México D.F. pp 34-53.
2. Harries Anthony D., Maher Dermot; TB/VIH: Manual clínico para América Latina; OMS, 1997, pp 13-47
3. Lugo de la Fuente Gustavo; Bacteriología Médica; Ed Cuellar; México, DF, 1999, pp 186-194
4. Chin James; El control de las enfermedades transmisibles; 17ª ed; Washington, D.C.: OPS, 2001, pp 646-660. Publicación Científica y Técnica No. 581
5. Epidemiología, Sistema Nacional de vigilancia epidemiológica. Num. 19 vol.18 semana 19, del 6 al 12 de mayo de 2001
6. Kumate Jesús, Gutiérrez Gonzalo, Muñoz Onofre, Santos José Ignacio; Manual de infectología clínica; 15ª ed; Méndez editores; México DF, 1998, pp 167-181
7. Perea Evelio J; Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica vol. II; Ed Doyma; Barcelona, España, 1992, pp 754-766
8. Secretaria de Salud. Programa de Acción: Tuberculosis; Programa Nacional de Salud 2001-2006, México, D.F. 2001
9. Grupos de riesgo: Informe de la OMS sobre la epidemiología de Tb 1996; Programa mundial contra la Tuberculosis; Ginebra Suiza.
10. Ciencia Médica, Vol. 1, Núm. 4, Boletín de la división de estudios de posgrado e investigación de la Facultad de medicina UNAM, Abril-Junio 1995; pp 10-43

11. Higuera Ramírez Francisco J, Hidalgo Loperena Hilda, Sánchez Carlos Javier, Lagunas Ramírez Alfonso, Romero Zamora José Luis; *Infectología*; Editorial Prado; México, D.F., 1996; pp 152-176
12. Davis Bernard D., Dulbecco Renato, Eisen Herman N, Ginsberg Harold S; *Tratado de microbiología*; 4a ed; Ed. Masson; Barcelona, España, 1996; pp 619-635
13. Acha Pedro N, Szyfres Boris; *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*; 2<sup>a</sup> ed; OPS, Washington, D.C., 1997; pp 70-76, 174-184
14. 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
15. Koneman Elmer W., Allen Stephen D., Janda William M, Schreckenberger Paul C and Winn Washington C; *Diagnóstico Microbiológico*; 5<sup>a</sup> ed; Ed Panamericana; Buenos Aires, Argentina, 1999, pp 867-926
16. Ratledge Colin and Dale Jeremy; *Mycobacteria, molecular biology and virulence*; Blackwell Science; Malden MA, USA, 1999; pp 198-259
17. Hale Yvonne M., E Pfyffer Gaby and Salfinger Max; 2001; *Laboratory Diagnosis of Mycobacterial infections: new tools and lessons learned. Clinical Infectious Diseases vol. 33:834-46*
18. Farga Victorino; *Tuberculosis*; 2<sup>a</sup>ed.; Ed. Mediterráneo; Santiago de Chile, 1992, pp 17, 107-108, 253-254
19. Allen BW, Baker FJ; *Mycobacteria. Aislamiento, identificación y pruebas de sensibilidad*; Ed Manual Moderno; México DF, 1976, pp 65-72
20. Universidad de las Naciones Unidas; *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



21. Cabello Romero; Microbiología y Parasitología humana; Ed. Panamericana; México, DF, 1993, pp 323-326
22. 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 33, 42, 94-95
23. Centro Panamericano de Zoonosis; Manual de normas y procedimientos técnicos para la bacteriología de la Tuberculosis; Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud, 1985; Nota Técnica No. 27
24. Castillo de Sánchez ML, Fonseca Yerena ME; Mejoría continua de la calidad, guía para los laboratorios clínicos de América Latina; Editorial Médica Panamericana; México, D.F., 1995; pp 7-15
25. Picazo Juan J, Casal Manuel; Procedimientos en microbiología clínica. Capítulo 9: Diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias; Barcelona, España, 1999
26. García Rojas Alma Leticia; Determinación de cuenta viable en vacuna BCG leofilizada por ensayo de una enzima; México, D.F., ENCB 1979
27. Protocolo de Buenos Aires, Argentina. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.
28. Comunicación personal del Dr. Oscar Rojas Espinosa, profesor de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB). Departamento de Inmunología
29. Balows Albert, Hausler William J; Manual clinical microbiology; fifth edition; American Society for Microbiology; Washington DC, 1991, pp 1259, 1261-1262, 1296
30. MacFaddin Jean F; Media for isolation cultivation-identification, maintenance of medical bacteria vol I; Ed William and Wilkins; Baltimore/London 1985, pp 458-464

31. Siddiqui H; Bactec Tb System. Product and Procedure manual; Becton-Dickinson, 1989, pp VI/1-VI/4
32. Murray Patrick, Kobayashi George S, Pfalter Michael A, Rosenthal Ken S; Microbiología Médica; 2a ed; Harcourt Brace; Madrid, España, 1997; pp 320-333
33. Olga Valdés Almaral, María Victoria Luna Martínez, Josefina Yip Aramillo, Carlos García Pino y Eugenio Cisneros D.; 1998; Gestión de la Calidad en los servicios especializados en nutrición e higiene de los alimentos. Rev Cubana Aliment Nutr Vol.12, No. 1 pp 64-70
34. Niño Hipólito V., Barrera Luis A.; Garantía de Calidad en el laboratorio clínico; Ed. Panamericana; Bogotá, Colombia; 1993, pp 355-356
35. Barquin Calderón Manuel y Col.; Sociomedicina; 4ª ed.; Méndez Editores; México, D.F., 1994; pp 814
36. Instituto Mexicano del Seguro Social; Instructivo de Operación para el diagnóstico bacteriológico de tuberculosis y micobacteriosis, 1998, pp 4-5, 7
37. 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
38. Behr MA, Warren SA, Salomón H, Hopewell PC, Ponce de León A, Daley CL, Smal PM; Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. LANCET 1999; 353:444-9
39. Casanueva Esther y Cols; Nutriología médica; 2ª ed; Panamericana; México, D.F., 2001; pp 114-115, 143
40. Estadísticas del Sector Salud y Seguridad Social, Cuaderno Núm. 17-18, edición 2001; INEGI; Aguascalientes, México

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

41. Dr. Torres López Javier, Echaniz Avilés Gabriela, Parra Maldonado Nélida Ruth, Eslava Carlos, Molina José, Conde González Carlos, Zamilpa Mejía Laura; PAC INFECTO-2. Unidad 7 Laboratorio de Microbiología; Aventis; México 2002, pp 396-405
42. Somoskovi Akos, Ködmón C, Lantos A, Bártfai Z, Tamási L, Fűzy J and Magyar Pál. 2000. Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated BACTEC MGIT 960 System, the BACTEC 460 TB System and Löwenstein-Jensen medium. *Journal of Clinical Microbiology* . 38: 2395-2397
43. Somoskovi Ákos and Magyar Pál. 1999. Comparison of Mycobacteria-growth indicator tube with MB Redox, Löwenstein-Jense and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* . 37: 1366-1369
44. Schluger Neil W. 2001. Changing approaches to the diagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 164: 2020-2024
45. 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
46. Herzog Basel H. 1998. History of Tuberculosis. *Respiration* 65:5-15
47. 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
48. Brändli Otto. 1998. The clinical presentation of Tuberculosis. *Respiration* 65: 97-105
49. Salfinger Max, Hale Yvonne M and Driscoll Jeffrey R. 1998. Diagnostic tools in tuberculosis. Present and future. *Respiration* 65: 163-170
50. Sebald M., Tacquet A et Bricout F; *Technique en bactériologie. 2. Anaerobies. Micobacteries. Virologie; 6a ed; Flammarion medecine-Sciences; Paris 1973; pp 136-141*
51. Bloom Barry R; *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control; American Society for Microbiology; Washington, D.C., 1994, pp 353-380*

52. Rico Méndez Gerardo, Montero Mora Patricia; Inmunología pulmonar básica; Trillas; México, D.F., 1991; pp 268-278
53. Mims Cedric A y otros; Microbiología médica; Mosby/ Doyma libros; Madrid, España 1995; pp 22.14-22.17
54. Day Robert A; Cómo escribir y publicar trabajos científicos; 2ª ed; OPS; Washington, D.C. 1995. Publicación científica No. 558
55. Alatorre Frenk Silvia, Mendiola Sanz Elsa, et-al; Antología de Estadística 2-4; Universidad Pedagógica Nacional; México, D.F., 1996-1997.
56. Carrillo Aguado José Luis. Quién le pone el cascabel a la Tuberculosis, un proyecto en busca del comportamiento del agente infeccioso. Conversus Núm 8 Febrero 2002, IPN; pp 8-19
57. Bailey & Scott's; Diagnostic microbiology; 10ª edición; Mosby; USA, 1998; pp 64-77
58. Dirección General de Control de Insumos para la salud, SSA; Guía de validación de medios de cultivo; Comité Nacional de Validación, Agosto 1990.
59. Marques M.J.; Probabilidad y estadística para ciencias químico biológicas; McGraw-Hill; México, 1991

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN