



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

CENTRO DE ESPECIALIDADES MÉDICAS DEL ESTADO  
DE VERACRUZ "DR. RAFAEL LUCIO".

**SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO DE  
MIDDLEBROOK 7H11 EN AGAR DE CAPA DELGADA COMPARADO CON EL  
MEDIO DE LÖWENSTEIN-JENSEN PARA PRUEBA DE  
DROGOSUSCEPTIBILIDAD DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO EN LA ESPECIALIDAD DE:

MEDICINA INTERNA

PRESENTA

DRA. ROCIO CABALLERO CABALLERO

ASESORES: DR. JESÚS RIVERA VARGAS.  
DRA. NORMA PALACIOS JIMÉNEZ.

JALAPA VERACRUZ.

FEBRERO 2002



CENTRO DE ESPECIALIDADES MEDICAS  
DEL ESTADO DE VERACRUZ  
"DR. RAFAEL LUCIO"

**DRA. ROCIO CABALLERO CABALLERO**  
**R-4 DE MEDICINA INTERNA**  
**PRESENTE.**

ME PERMITO INFORMO A USTED QUE EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN, "SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO DE MIDDLEBROOK 7H11 EN AGAR DE CAPA DELGADA COMPARADO CON EL MEDIO DE LÖWSTEIN-JENSEN PARA PRUEBA DE DROGOSUSCEPTIBILIDAD DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS", DESPUES DE HABERLO ANALIZADO LAS COMISIONES DE INVESTIGACIÓN Y DE ETICA, SU PROYECTO FUE APROBADO CON EL NÚMERO 06/2001, PARA LLEVARSE A CABO EN ESTE HOSPITAL.

LE DESEAMOS ÉXITO EN LA REALIZACIÓN DE SU PROYECTO.

**ATENTAMENTE**  
**XALAPA, VER., 22 DE JUNIO DE 2001**

**DR. MIGUEL IVAN HERNANDEZ GUTIERREZ**  
**DIRECTOR GENERAL**

DR. MIHG/DR. SRGC/brnd



**CENTRO DE ESPECIALIDADES MÉDICAS  
DEL ESTADO DE VERACRUZ  
"DR RAFAEL LUCIO"**

**DR. MIGUEL IVAN HERNANDEZ GUTIERREZ  
DIRECTOR GENERAL  
P R E S E N T E.**

POR MEDIO DEL PRESENTE, INFORMO A USTED QUE LA COMISION DE ETICA, APROBO EL PROYECTO DE INVESTIGACION QUE PRESENTA LA DRA. ROCIO CABALLERO CABALLERO, MEDICO RESIDENTE DE CUARTO AÑO DE MEDICINA INTERNA, TITULADO "SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO DE MIDDLEBROOK 7H11 EN AGAR DE CAPA DELGADA COMPARADO CON EL MEDIO DE LÖWSTEIN JENSEN PARA PRUEBA DE DROGOSUSCEPTIBILIDAD DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS", PARA LLEVARSE A CABO EN ESTA INSTITUCION.

SIN OTRO PARTICULAR, QUEDO DE USTED.

**A T E N T A M E N T E  
KALAPA, VER., 22 DE JUNIO DE 2001**

  
**DR. CARLOS M. CONTRERAS  
SECRETARIO DE LA COMISION DE ETICA**



SERVICIOS DE SALUD  
DE VERACRUZ  
SOCONUSCO No. 31  
COL. AGUACATAL  
C.P. 91130

DIRECCION GENERAL  
DIRECCION DE SERVICIOS DE SALUD  
SUBDIRECCION DE PREVENCIÓN Y CONTROL  
DE ENFERMEDADES

DEPTO. DE CONTROL DE ENFERMEDADES

OFICIO No. 821 CIRCULAR No. \_\_\_\_\_

ASUNTO: Aceptación de protocolo de investigación.

19577

Xalapa, Ver., a 6 de junio de 2001.

DOCTORA  
ROCIO CABALLERO CABALLERO  
MEDICO RESIDENTE MEDICINA INTERNA  
CEMEV "DR. RAFAEL LUCIO"  
AV. RUIZ CORTINES # 2903  
XALAPA, VER.  
P R E S E N T E

Informo a usted que la Jurisdicción No. V de Xalapa le brindará todas las facilidades para la realización de su trabajo de investigación, por lo que las actividades se efectuarán conjuntamente con el personal de la misma.

No omito mencionar que esperamos contar con los resultados de los estudios de drogossensibilidad, con la finalidad de brindar una mejor atención a los pacientes en forma inmediata.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"SU FRAGIO EFECTIVO. NO REELECCION".  
JEFA DEPARTAMENTO DE PREVENCIÓN Y CONTROL  
DE ENFERMEDADES

  
DRA. MARCELINA GARCÍA GARCÍA



c.c.p. Dr. José Alfredo Quintana P. Jefe del área de Medicina Interna, Centro de Especialidades Médicas del Estado de Veracruz "Dr. Rafael Lucio" Av. Ruiz Cortines # 2903.



Coordinación de Enseñanza e Investigación  
Clínica Hospital 30 04 00  
Xalapa, Ver. 4 de junio de 2001

C. Dra. Rocio Caballero Caballero  
Médico Residente de Medicina Interna  
CEMEV  
PRESENTE.

A través de este conducto le informo que, posterior a la reunión del Comité de Investigación Local de esta clínica, habiendo hecho las sugerencias y presentadas por Ud en relación al protocolo presentado: "Sensibilidad y Especificidad del medio de cultivo Middlebrook 7H11 en agar de capa delgada comprobado con el medio Lowenstein Jensen para pruebas de drogasuceptibilidad de Mycobacterium Tuberculosis", este comité no tiene inconveniente en aceptarlo y brindarle el apoyo para el buen término del mismo.

Le envió un cordial saludo.

  
ATENTAMENTE

**Rocio Caballero Caballero**  
Secretario Técnico del Comité Local de Investigación  
E INVESTIGACIÓN

**CLINICA HOSPITAL I.S.S.S.T.E**  
**X A L A P A**

**AGRADECIMIENTOS:**

A **DIOS** por todo lo que me ha dado.

A mis maestros, quienes me han transmitido información y experiencia necesarias para mi desempeño como **MÉDICO**.

A la **DRA. NORMA PALACIOS JIMÉNEZ** médico adscrito del Hospital de Infectología del Centro Médico La Raza (HI CMR IMSS), **DR. LUIS CASANOVA CARDIEL** Investigador asociado de la Unidad de Investigación Médica de Inmunología e Infectología, **DR. JOSÉ LUIS FUENTES ALLEN** Jefe del servicio de Infectología del HI CMR I.M.S.S. quienes me proporcionaron los recursos económicos y la información necesarios para la realización de este proyecto de investigación.

Al **DR. JESÚS RIVERA VARGAS**, por su asesoría en la elaboración del proyecto de investigación.

**DEDICATORIA.**

A mis **PADRES** a quienes admiro y cuyos deseos de superación me han contagiado y me han servido de aliciente.

A mis hermanos **HUGO, KARINA, ADAN y LEOVY.**

A mis amigos quienes hacen más bella mi existencia: **BÁRBARA, ANA LILIA Y CURIEL.**

**ÍNDICE:**

Título.....	1
Agradecimiento.....	2
Dedicatoria.....	3
Índice .....	4
I.- Introducción.....	6
II.- Antecedentes.....	7
III.- Justificación.....	13
IV.- Planteamiento del problema.....	14
Problema general.....	14
Problemas específicos.....	14
V.- Hipótesis.....	15
Hipótesis general.....	15
Hipótesis específicas.....	15
VI.- Objetivos.....	17
Objetivo general.....	17
Objetivos particulares.....	17
VII.- Material y métodos.....	19
Criterios de inclusión.....	19
Criterios de exclusión.....	19
Criterios de eliminación.....	19



VIII.- Universo de trabajo.....	20
IX.- Diseño del estudio.....	20
X.- Tamaño del estudio.....	20
XI.- Descripción general del estudio.....	21
XII.- Variables.....	29
XIII.- Bibliografía .....	34
XIV.- Análisis de datos.....	38
XV.- Resultados.....	38
XVI.- Discusión.....	52
XVII.- Anexos.....	53
Hoja de recolección de datos.....	53
Flujograma de actividades.....	57

## I.- INTRODUCCIÓN:

Robert Koch descubrió en 1882 que la Tuberculosis (TB) era causada por *Mycobacterium tuberculosis* desde entonces se han hecho esfuerzos para entender y controlar esta enfermedad. Sin embargo es un grave problema de salud pública que ha aumentado en los últimos años en países industrializados y en desarrollo, de forma paralela a la infección por VIH, y al mismo tiempo han surgido cepas drogoresistentes.

El diagnóstico esta basado en la detección de la micobacteria mediante baciloscopias y cultivo, sin embargo para obtener una baciloscopia positiva se requieren más de 10,000 microorganismos/ml., por lo tanto el porcentaje de baciloscopias negativas en pacientes con enfermedad activa oscila entre 50 y 60%.

En años recientes, nuevos métodos de laboratorio se han diseñado para detectar o identificar micobacterias aplicando técnicas de biología molecular y radioisótopos, que han disminuido sustancialmente el tiempo requerido para reportar los resultados, con la ventaja de mejorar su sensibilidad.

Este logro es debido principalmente a la introducción de técnicas radio métricas así como el uso de técnicas moleculares como la amplificación genómica basadas en la detección temprana de cultivos positivos. Sin embargo para laboratorios clínicos pequeños en naciones subdesarrolladas la implementación de esta tecnología es aún excesivamente costosa.

Esto parece ser un problema para laboratorios de ciudades industrializadas en las cuales los kits comerciales para PCR no están disponibles para su uso rutinario.

El desarrollo de métodos de cultivo mejorados puede presentar una ventaja para laboratorios limitados en recursos. El agar de capa delgada con medio de Middlebrook 7H11 (TL7H11) para detección de microcolonias es un método ya utilizado que permite una identificación más temprana de micobacterias y se ha propuesto como un alternativa económica y rápida con impacto en el diagnóstico y tratamiento adecuado de pacientes con tuberculosis pulmonar.

## II.- ANTECEDENTES:

La tuberculosis es un grave problema de salud pública que ha aumentado notablemente en los últimos años en países industrializados y en desarrollo, según indican las tasas de morbilidad (1,2).

En la última década la tuberculosis (TB), corresponde a una de las principales causas de muerte (cerca de 3 millones / año) (3). Se estima que un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* y que existen 8.8 millones de casos nuevos anuales que corresponden a 52,000 muertes semanales o más de 7,000 diarias, y 1,000 casos nuevos cada hora (4,5) (2) El 80% de los pacientes con tuberculosis se encuentran en edad económicamente productiva de 15 a 49 años. El advenimiento del SIDA ha contribuido al resurgimiento de la enfermedad en países industrializados (6).

El número de casos nuevos de tuberculosis reportados en México hasta la semana 52 del 2000, fueron 15,201 comparado con 16,168 en 1999, lo cual muestra un descenso relativo, habrá que destacar que el estado de Veracruz ocupó el primer lugar con 1,875 casos reportados, sin embargo son cifras estimadas por que existe subregistro de casos a nivel nacional. (7).

Esta situación particularmente en naciones industrializadas ha favorecido el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas como parte de las estrategias para alcanzar un mejor control de esta enfermedad infectocontagiosa.

La detección de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) por examen microscópico y cultivo sigue siendo fundamental para el diagnóstico y tratamiento oportuno de la enfermedad. Sin embargo la sensibilidad varía de 22 a 65% (8) por otro lado en el 10 a 20% de los casos no hay crecimiento del bacilo en los medios de cultivo. (9,10)

Por lo anterior se han propuesto métodos que permitan un diagnóstico rápido y oportuno de la TB. Durante los 60s múltiples investigadores se dedicaron a la búsqueda de medios de cultivo (Agar) que disminuyeran el tiempo de desarrollo de la micobacteria, basado en la observación microscópica de la morfología colonial (11)

El medio Middlebrook 7H9 ( líquido) y los medios 7H10 Y 7H11 ( agar) se utilizan para favorecer el crecimiento rápido de las micobacterias, sobre todo los medios líquidos pero su principal desventaja de estos como de otros incluyendo Löwenstein-Jensen (LJ) , Petraghani es su crecimiento lento de 6 a 8 semanas. Algunos investigadores han intentado la combinación de medios de cultivo

sólidos y líquidos (bifásicos) con la finalidad de reducir el tiempo de identificación de la micobacteria, aspecto que no ha dado resultados consistentes hasta el momento actual.

Las Técnicas Radiométricas (BACTEC) fueron introducidas en micobacteriología por Cummings y colaboradores en 1975. Otros métodos radiométricos y no radiométricos cuya finalidad es disminuir el tiempo de desarrollo e identificación de las micobacterias han sido introducidos como el sistema BACTEC (Becton Dickinson Diagnostic Instruments, Cockeysville, MD), el sistema no radiométrico MB/BacT (Organon Teknika, Durham, NC), el sistema ESP Myco (Trek Diagnostics, Westlake, Ohio), El sistema Septi-Chek (Becton Dickinson Microbiology Systems Cockeysville, MD) y el sistema MGIT (Becton Dickinson Microbiology Systems)(12).

El Bactec 460 tiene ventajas sobre otros medios convencionales como favorecer el crecimiento rápido en 9 a 14 días. Este método utilizan el ácido palmítico marcado con carbono 14; la micobacteria al metabolizar el ácido palmítico, libera el CO<sub>2</sub> marcado el cual se registra como un índice de crecimiento. Pero su desventaja es que requiere material radioactivo, personal especializado y un área especial, por lo cual algunos autores consideran que el tiempo que se gana con el método no justifica el uso radioisótopos con una vida media de 5,736 años (13)

Morgan y cols, publicaron en 1983 un estudio comparativo entre el método radiométrico BACTEC y los medios convencionales (Middlebrook 7H10, 7H11, y Löwenstein-Jensen) para aislar *M. tuberculosis* a partir de muestras BAAR negativo encontrando de un total de 2,165 muestras estudiadas 71 cultivos positivos, de los cuales fueron detectados el 71.8% por el sistema BACTEC comparado con el 88.7% de los 3 medios convencionales cuando fueron comparados individualmente el medio BACTEC (Middlebrook 7H12) recuperó la micobacteria en el 71.8% más que el L-J (62%). El medio Middlebrook 7H10 (55.9%), o el medio Middlebrook S7H11 (52.1%) (14).

Otras pruebas incluyen la detección del ácido micólico de la pared celular de la micobacteria, hay 3 procedimientos que se utilizan: 1) la cromatografía con gas líquido, 2) la cromatografía de presión líquida, y 3) la cromatografía de capa delgada. En un análisis realizado por Smith y cols. la cromatografía en gas líquido combinada con el análisis computado de todos los especímenes identificaron correctamente 79% incluyendo el 77% de *M. tuberculosis*, y el 83% de todas las micobacterias del complejo *M. avium-intracellulare* (MAI), el uso de la morfología de las microcolonias y el ácido nucleico en combinación con la cromatografía en gas líquido puede identificar rápidamente al bacilo. (15)

La amplificación *in vitro* del DNA de *M. tuberculosis* es rápida con un tiempo de detección menor a 8 hrs., y existen dos kits comerciales disponibles aprobados por la FDA: examen directo (MTD), y AMPLICOR MTB KIT (Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ), tienen una sensibilidad del 95%, y una especificidad del 96% en algunos estudios (16) sin embargo la búsqueda de DNA en expectoración por PCR no son tan sensibles como los métodos de cultivo tradicionales y se ha reportado una sensibilidad del 43 al 74% (17), por otro lado esta técnica es altamente compleja y costosa esta muy lejos de ser utilizada en áreas rurales de países en desarrollo (18).

Harboe y cols., reportaron por primera vez el complejo antigénico específico de *M. tuberculosis*, llamándolo MPT64 (MPB64), que se ha empleado como método diagnóstico con una especificidad del 100% y una sensibilidad del 98.1%, y su tiene como ventajas la comodidad en la toma de la muestras y los resultados en 1-2 días. Sin embargo no está al alcance de nuestra población por requerir tecnología avanzada (16).

El agar de capa delgada 7H11 (TL7H11), es un medio expuesto en los 60's que se utiliza para la detección de microcolonias de micobacterias (19) y permite la detección rápida así como el reconocimiento precoz del bacilo aislado, se ha propuesto recientemente como una alternativa económica para detección rápida del desarrollo de la micobacteria (20) y se ha realizado una adaptación del método utilizando medios bifásicos y laminillas siliconadas, (18).

Mejía y cols. Realizaron un estudio comparando la sensibilidad y tiempo de detección con el método de detección de microcolonias en agar de placa

deigada (TL7H11), y el cultivo convencional Löwenstein-Jensen (LJ), encontraron que más del 60% de las muestras positivas fueron detectadas dentro de los primeros 10 días en TL7H11 y ninguna en L-J, después de 2 semanas más del 80% fueron positivas en TL7J11 y en L-J 4.57% ( $P < 0.001$ ), la morfología de las microcolonias fue 100% distintiva para *M. tuberculosis* en TH7H11.

El costo calculado de TL7H11 preparado en el laboratorio fue de US\$2.90/medio, concluyendo que el método TL7H11 es un método rápido, económico, y una alternativa para el diagnóstico de la infección por la *M. tuberculosis*. (21)

Al mismo tiempo cepas de *M. tuberculosis* multidrogoresistentes han surgido en países desarrollados y en vías desarrollo, el centro para control y prevención de enfermedades de Atlanta (CDC) ha establecido recomendaciones, que incluyen la notificación inmediata de un caso sospechoso, la identificación y aislamiento de la *M. tuberculosis* dentro de los 10-14 días y pruebas de drogasusceptibilidad. El método estándar para medición de susceptibilidad consiste en la inoculación de la micobacteria en un medio sólido (Löwenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 o Middlebrook 7H11) con incubación 35-37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5-10%, las colonias de *M. tuberculosis* son aisladas después de 21 días (22).

Se ha propuesto el sistema BACTEC 460 MTB, para su aislamiento en corto tiempo hasta de 5 días dependiendo del tamaño de la muestra (23). Se han realizado estudios comparativos entre los métodos estándar y el sistema MB/BacT (método no invasivo de detección colorimétrica) tanto para detección de micobacterias como la medición de susceptibilidad, encontrando que este último es preciso, y los resultados de los exámenes de susceptibilidad se obtuvieron a los 7 días y tiene como ventajas no utilizar radioisótopos y el bajo riesgo de contaminación durante las lecturas. (24)

En 1996 la resistencia a los fármacos antituberculosos de primera línea en Estados Unidos se observó en el 13.2% de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas (25) aproximadamente el 8% fueron resistentes a isoniacida (HAIN) comparadas con 8.2%, en 1995, con el más alto rango de resistencia en personas extranjeras. En 1996 la resistencia a rifampicina se encontró en 2.5% de las cepas comparada con 2.6% en 1995. (25,26). Los más altos rangos de resistencia se encontraron en extranjeros, VIH positivos, y aquellos con tratamiento antituberculoso previo. (26,27)

En un estudio realizado en la Ciudad de México en 1976 sobre droga resistencia de un total de 126 muestras, 23 (18.2%) mostraron resistencia a isoniacida y estreptomycin, aunque el estudio se orientó a drogoresistencia primaria se considera que es difícil diferenciar entre pacientes que no han recibido tratamiento previo con antituberculosos al utilizar estos antibióticos para infecciones no relacionadas a micobacterias (28)

Entre 1979 y 1981 se realizó una investigación sobre drogoresistencia primaria en 12 entidades Federativas de México. Este recopiló información de 1000 pacientes con diagnóstico de tuberculosis con un total de 1051 muestras de las cuales 226 fueron analizadas ya que en el resto se tuvo antecedente de uso de drogas antituberculosas o la información sobre esto se desconocía. De las 226 muestras 43 mostraron resistencia a algún medicamento en la siguiente distribución: estreptomycin 15.4%, isoniacida 6.6%, etambutol 1.7%, ácido paraaminosalicílico 1.3%, rifampicina 0.8% y protonamida 0.4%

La droga resistencia a más de un fármaco se encontró en 16 muestras (37.2%), siendo más frecuente a la combinación de isoniacida y estreptomycin en el 20.9% sin encontrarse resistencia la combinación de isoniacida y rifampicina. El grupo de edad más afectado en drogoresistencia fué de 25 a 44 años con 44.2%, siendo los Estados más afectados Sonora, Chihuahua, Guerrero, Nuevo León y Baja California (29).

Estudios realizados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México entre los años 1990 y 1993 en análisis de expectoración de 232 pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar drogoresistente, mostró que la droga resistencia a isoniacida fue del 62.5%, a rifampicina del 60.3%, a estreptomycin 37.1% a etambutol del 25.1%. La droga resistencia a dos drogas como la isoniacida con estreptomycin del 3.4%. El factor que se consideró responsable de esta droga resistencia fué la administración irregular de los medicamentos ya fuera por incumplimiento, reacciones adversas o monoterapia. En otros casos se encontró uso previo de medicamentos en especial de rifampicina, y estreptomycin para infecciones respiratorias no asociadas a *Mycobacterium tuberculosis* (30)

En otro estudio realizado en la Ciudad de México en el Instituto Nacional de la Nutrición se encontró en el periodo de 1989 a 1991 84 pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar de ellos 59 (70%) resultaron sensibles y el

resto 25 (30%) fueron resistentes. En 16 (19% del total de casos) la resistencia fue a isoniacida y rifampicina. No se encontró diferencia de las manifestaciones clínicas entre estos pacientes y los que mostraron drogossensibilidad. Los factores de riesgo que pudieran considerarse fueron la infección concomitante por el virus de VIH y los trabajadores de la salud que atienden a estos pacientes (31).

García García, Ponce de León y cols., publicaron en marzo 2000 (Archives of Internal Medicine), un estudio epidemiológico, de TB drogoresistente del sureste de México encontrando 238 muestras con *M. tuberculosis* una resistencia de 28.4% y 10.8% de multidrogoresistencia después del tratamiento 75% fueron curados, 8% abandonaron el tratamiento, 9% tuvieron falla al tratamiento y 4% murieron. (32)



### III.- JUSTIFICACIÓN:

Nos encontramos en una época de grandes avances tecnológicos aplicados a la Medicina, específicamente los métodos de detección de *Mycobacterium tuberculosis* han mostrado desarrollo, por un lado buscando una mayor sensibilidad y especificidad y acortando en lo posible el tiempo de crecimiento surgiendo así métodos radiométricos como el BACTEC, métodos de amplificación genómica de DNA (PCR), cromatográficos, y más recientemente identificación de porciones antigénicas del *M. tuberculosis*, con ingeniería genética dirigida. Sin embargo estos métodos no están al alcance de nuestra población por el costo y el empleo de personal e instalaciones altamente especializadas.

Por lo anterior proponemos la utilización del método de agar de capa delgada para identificación temprana de micobacterias así como una herramienta alternativa para la realización de pruebas de drogasusceptibilidad en menor tiempo, con el sustento de ser un método relativamente económico y factible de aplicar en cualquier laboratorio de bacteriología de nuestro país con repercusión clínica en el diagnóstico, tratamiento antituberculoso y el impacto en el caso de tuberculosis drogoresistente.

#### IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

##### PROBLEMA GENERAL

¿Cual es la sensibilidad y especificidad del agar de capa delgada con medio Middlebrook 7H11 comparado con el método de proporciones en medio de Löwestein-Jensen para pruebas de drogasusceptibilidad para *M. tuberculosis*?

##### PROBLEMAS ESPECIFICOS:

- a) ¿Cual es el patrón de drogasusceptibilidad del bacilo tuberculoso en los medios comparados para la isoniacida?
- b) ¿Cual es el patrón de drogasusceptibilidad del bacilo tuberculoso en los medios comparados para la rifampicina ?
- c) ¿Cual es el patrón de drogasusceptibilidad del bacilo tuberculoso en los medios comparados para el etambutol?
- d) ¿Cual es el patrón de drogasusceptibilidad del bacilo tuberculoso en los medios comparados para la estreptomocina?
- e) ¿Cual es el tiempo de crecimiento de las micobacterias en el medio de Löwestein Jensen comparada con el medio Middlebrook 7H11?
- f) ¿Cual es la frecuencia de la drogoresistencia en la población estudiada para la isoniazida?
- g) ¿Cual es la frecuencia de la drogoresistencia en la población estudiada para la rifampicina?
- h) ¿Cual es la frecuencia de la drogoresistencia en la población estudiada para el etambutol?
- i) ¿Cual es la frecuencia de la drogoresistencia en la población estudiada para la estreptomocina?

## V.- HIPÓTESIS:

### HIPÓTESIS GENERAL

**La sensibilidad y la especificidad del Medio Middlebrook 7H11 es igual al método de proporciones en el medio Löwestein-Jensen para pruebas de drogasusceptibilidad para *M. tuberculosis***

### HIPÓTESIS ESPECÍFICA:

- a) El patrón de drogasusceptibilidad del bacilo tuberculoso es el mismo en los dos medios comparados para la isoniazida.
- b) El patrón de drogasusceptibilidad del bacilo tuberculoso es el mismo en los dos medios comparados para la rifampicina.
- c) El patrón de drogasusceptibilidad del bacilo tuberculoso es el mismo en los dos medios comparados para el etambutol.
- d) El patrón de drogasusceptibilidad del bacilo tuberculoso es el mismo en los dos medios comparados para la estreptomycin.
- e) El tiempo de crecimiento de las micobacterias es menor en el medio Middlebrook 7H11 comparada con el medio de Löwestein Jensen .
- f) La frecuencia de la drogoresistencia para la isoniacida es mayor en la población estudiada.
- g) la frecuencia de la drogoresistencia para la rifampicina es mayor en la población estudiada.

- h) la frecuencia de la drogoresistencia para el etambutol es mayor en la población estudiada.
- i) la frecuencia de la drogoresistencia para la estreptomina es mayor en la población estudiada.

## VI.- OBJETIVOS:

### OBJETIVOS GENERALES:

**Determinar la sensibilidad y la especificidad del medio de Middlebrook 7H11 comparada con Löwestein Jensen para el estudio de drugosusceptibilidad.**

### OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Determinar el patrón de drugosusceptibilidad de los bacilos en cada uno de los medios comparados para la isoniazida
- b) Determinar el patrón de drugosusceptibilidad de los bacilos en cada uno de los medios comparados para la rifampicina.
- c) Determinar el patrón de drugosusceptibilidad de los bacilos en cada uno de los medios comparados para el etambutol.
- d) Determinar el patrón de drugosusceptibilidad de los bacilos en cada uno de los medios comparados para la estreptomina.
- e) Identificar el tiempo de crecimiento de las micobacterias en el medio Middlebrook 7H11 comparado con el Löwestein-Jensen.
- f) Identificar la frecuencia de la drugoresistencia para la isoniacida en la población estudiada
- g) Identificar la frecuencia de la drugoresistencia para la rifampicina en la población estudiada

- h) Identificar la frecuencia de la drogoresistencia para el etambutol en la población estudiada
  
- i) Identificar la frecuencia de la drogoresistencia para la estreptomycin en la población estudiada

## VII.- MATERIAL Y METODOS:

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Cualquier sexo
2. Mayores de 18 años
3. Caso sospechoso de tuberculosis pulmonar activa
4. Pacientes con baciloscopia positiva o negativa
5. Que proporcionen 3 muestras de expectoración, espontánea, jugo gástrico, inducida, u obtenida por fibrobroncoscopia
7. Pacientes con o sin VIH positivo u otra enfermedad comorbilidad
8. Que acepten ingresar al protocolo y firmen la hoja de consentimiento informado.

### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Aquellos que no proporcionen 3 muestras de expectoración

### CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:

- Pérdida de la muestra

## VIII.- UNIVERSO DE TRABAJO

Se incluirán 50 pacientes con alta sospecha clínica de tuberculosis pulmonar que acudan a recibir atención al Centro de Especialidades Médicas del Estado de Veracruz "Dr. Rafael Lucio", clínica del ISSSTE de la ciudad de Jalapa Veracruz, derivados del Centro Estatal de Referencia de Tuberculosis del estado de Veracruz a partir del 1o. de junio del 2001

## IX.- DISEÑO DEL ESTUDIO:

Prueba diagnóstica (sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo) del agar de capa delgada con medio de Middlebrook comparado con el método de proporciones en el medio de Löwestein- Jensen

## X.- TAMAÑO DE LA MUESTRA:

Se realizará un estudio con 50 muestras.



## XI.-DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Incluiremos a todos los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión y que acepten participar en el estudio, previa firma de hoja de consentimiento informado, enviados del Centro Estatal de Referencia de Tuberculosis del estado de Veracruz, Jurisdicción no. 5, de los hospitales Centro Médico de Especialidades Dr. Rafael Lucio, clínica del ISSSTE, derivados de las áreas hospitalización y consulta externa. A todos se les realizará una encuesta, exploración física y tele de tórax que serán interpretadas por el médico residente encargado del protocolo de investigación, se obtendrán 3 muestras de expectoración a las que se realizará tinción de Zielh Neelsen, el resto de la muestra de expectoración se descontaminará en el área de laboratorio del CEMEV y posteriormente se sembrará en caldo de cultivo de Middlebrook, enviándose en un termo con anticongelante al Hospital de Infectología del Centro médico La Raza, donde se realizará cultivo en los dos medios de estudio TL7H11 y Löwestein Jensen. Se verificará el tiempo de crecimiento de las micobacterias y al contar con cultivo positivo se realizará identificación de la micobacteria, y posteriormente pruebas de drogasusceptibilidad comparando los resultados entre sí. Los resultados obtenidos se enviarán a las instituciones participantes.

A las muestras de expectoración se realizarán los siguientes procedimientos:

### *Técnica de Ziehl- Neelsen.*

#### Reactivos

- a) Fucsina fenolada (carbol fucsina)
- b) Azul de metileno.
- c) Solución decolorante ( alcohol-ácido)

#### Método:

- a) Fijar la laminilla por calor
- b) Cubrir la preparación con carbol fucsina y calentar a emisión de vapor de 5-7 minutos cuidando que no se seque el colorante.
- c) Lavar con agua de la llave.
- d) Decolorar con alcohol ácido durante 1 minuto.
- e) Lavar con agua y colocar el azul de metileno durante 20 a 30 segundos.
- f) Lavar y secar al aire (1 a 2 minutos)
- g) Examinar con un objetivo x 100 con aceite de inmersión
- h) Los bacilos ácido alcohol resistentes se tiñen de rojo y el fondo de azul claro.

#### Resultados de la baciloscopia.-

Negativo (-): No se encuentran bacilos ácido alcohol resistentes en 100 campos observados.

Positivos (+): Menos de 1 bacilo por campo en promedio, en 100 campos observados.

Positivos (++) : de 1 a 10 bacilos por campo en promedio, en 50 campos observados.

Positivos (+++) :\_ más de 10 bacilos ácido alcohol resistentes por campo en 20 campos observados.

Si se observan 1 a 4 bacilos en 100 campos se realizará lo siguiente:

- a) Ampliar la lectura en 200 campos adicionales.
- b) Si no observan más bacilos se deberá hacer otro frote de la misma muestra.
- c) Si la lectura de este segundo extendido no modifica el resultado anterior, la muestra se informara como negativa y se solicitará nueva muestra.
- d) Se cultivarán muestras con hallazgo de 1 a 4 bacilos

### Método de Petroff ( descontaminación álcali-ácido)

- a) Hidróxido de sodio al 4% con rojo fenol
- b) Ácido clorhídrico 1 N.

Descontaminación, concentración y cultivo del esputo.

- 1) Mezclar el esputo con igual cantidad de NaOH al 4%.
- 2) Agitar de 15 a 30 minutos y vaciar a un tubo de plástico estéril
- 3) Centrifugar a 300 rpm durante 5 minutos, no abrir la centrifuga hasta que se haya detenido por completo.
- 4) Decantar cuidadosamente el sobrenadante y depositarlo en el frasco original.
- 5) Resuspender el sedimento alcalino en 10 a 20 ml de agua estéril y centrifugar nuevamente por 20 minutos. Puede vaciarse la muestra o una parte de ella (2 ml) en un tubo con tapón de rosca que contenga NaOH al 4% con rojo fenol en igual cantidad que el esputo. Agitar el tubo en vortex por 20 segundos antes de incubar a 37°C durante 5 minutos. Terminada la incubación, centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
- 6) Eliminar cuidadosamente el sobrenadante en el frasco original. Neutralizar el sedimento con ácido clorhídrico (HCL) 1 N o ácido sulfúrico al 8%. El procedimiento de neutralización se debe ser muy cuidadoso, de manera que el pH no sea inferior a 6.5 ni superior a 7.2

- 7) Decantar cuidadosamente y sembrar 2 a 3 gotas del sedimento con pipeta Pasteur a dos tubos de Löwestein-Jensen (quitar el agua de condensación antes de sembrarlo).
- 8) Hacer un frote con el asa o pipeta Pasteur y teñir por Z-N. Observar y anotar resultado (presencia o ausencia de BAAR).
- 9) Incubar los tubos a 37°C, dejándolos en posición horizontal durante 8 horas.
- 10) Examinar semanalmente los cultivos hasta la doceava semana. Si no hay desarrollo se informarán como negativos.

#### Resultados del cultivo.

Positivo (+++): colonias confluentes.

Positivo (++) : colonias separadas (más de 100).

Positivo (+) 20 a 100 colonias.

Positivo (# bacilos): número total de colonias en los tubos sembrados, si hay menos de 20.

Negativo (-): No se observan colonias.

Contaminado ( C): Cultivo contaminado.

BAAR (+): micobacterias en tipificación.

#### Medio de Löwestein-Jensen

##### Composición del medio:

- 1) Fosfato monopotásico anhidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- 2) Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- 3) Citrato de Magnesio
- 4) L-asparagina
- 5) Glicerina bidestilada
- 6) Agua destilada

- 7) Huevos enteros.
- 8) Verde malaquita al 2% (agente inhibidor).

Pruebas de drogasusceptibilidad:

Método de las proporciones:

1. Propuesto por Canneti, Rist y Grosset, consiste en determinar la proporción de mutantes resistentes para cada medicamento presentes en la cepa.
2. Se emplea el medio de L-J sólo y adicionado de medicamentos. El primero nos permite conocer el número total de la población bacilar sembrada y el segundo, observar el número de mutantes resistentes.
3. La cepa usada para el estudio debe tener un buen crecimiento ( como mínimo 10 colonias) y por lo menos 30 días de desarrollo. Si el número de colonias es menos de 10, la muestra no es representativa de la población bacilar de las lesiones.

Preparación del medio de cultivo:

1. Los medios de cultivo sin y con medicamentos se deben preparar al mismo tiempo y su duración es de un mes a partir de la fecha de su preparación, si es que se les mantiene en refrigeración entre 4° y 8° C.
2. Los medicamentos se incorporaran antes de la coagulación del medio y la cantidad precisa de cada uno se llama concentración crítica.
3. La proporción crítica o criterios de resistencia, es la proporción de mutantes resistentes de una población bacilar por encima de la cual la cepa es considerada como resistente.

4. Con base en los parámetros de concentración crítica del medicamento y de proporción crítica de mutantes resistentes se diferencia una cepa sensible de otra resistente.

Medicamento	Concentración * mg/ml	Proporción crítica (%)
Isoniacida	0.2	1
Estreptomicina	4.0	1
Rifampicina	40.0	1
Etambutol	2.0	1

\*Concentración crítica de los medicamentos en el medio de L-J antes de la coagulación.

Agar de capa delgada con medio Middlebrook 7H11 (TL7H11)

1. Las muestras de expectoración se someterán a descontaminación y digestión (Método de Petroff modificado, mencionado previamente)
2. Se tomarán 0.1 ml del sedimento y se inocularan las placas de agar de capa delgada con medio de Middlebrook 7H11.
3. Después de la inoculación se incubaran a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%
4. Se evaluarán las placas de agar 7H11 con microscopio de luz con el objetivo 40x en toda su superficie (por lo menos dos cuadrantes), al observar colonias se utilizará el objetivo (inmersión), 100x para determinar la morfología colonial.

5. Al contar con desarrollo de colonias (por lo menos 50) se realizará identificación.
6. Para la prueba de drogasusceptibilidad se agregarán los antituberculosos antes de la coagulación del medio.
7. Las siguientes concentraciones críticas (las utilizadas con el método radiométrico) se emplearán en este medio.

Concentraciones críticas para el agar de capa delgada (TL 7H11)

Medicamentos	Concentración crítica mg/ml
Isoniacida	0.1
Rifampicina	2
Estreptomocina	4
Etambutol	7.5

Preparación de soluciones madre (stock) de medicamentos y sus diluciones.

1. Se preparan utilizando como solvente agua destilada estéril (isoniacida, estreptomocina y etambutol) o dimetilformamida (rifampicina)
2. Se van a preparar las soluciones madre a partir del medicamento puro, pesado y disuelto en el solvente adecuado, el mismo día en que se prepara el medio de cultivo. Las soluciones de medicamento no requieren ser esterilizadas. Estas soluciones se pueden volver a utilizar, conservándose en refrigeración, hasta 30 días después de su preparación.
3. Las diluciones de los medicamentos deben prepararse el mismo día de su uso. Las cantidades sobrenadantes deben ser desechadas. Cada dilución se mezcla bien por agitación antes de preparar la siguiente.
4. La dilución del medicamento contenida en 1 ml se incorporara en 500mls del medio de cultivo, mezclándolo por agitación durante 5 minutos.

5. La temperatura de coagulación no debe ser mayor de 85°C y el tiempo de coagulación no debe exceder de 45 minutos. Una vez distribuido y coagulado el medio adicionado del medicamento, se deja a temperatura ambiente para que se enfríe.
6. El medio con los medicamentos incorporados se conservara en refrigeración bien resguardado para evitar su desecación.

Reactivos:

Patrón turbimétrico para ajustar las suspensiones bacilares "madre" de la cepa en estudio: Tubo número 1 de Mc Farland que tiene una turbidez semejante a la de una solución de 1 mg de masa bacilar suspendida en 1 ml de agua bidestilada.

Método:

1. Tomar con el asa metálica el mayor número posible de las colonias desarrolladas en los medios de cultivo y colocadas en el matraz con perlas de vidrio, al que previamente se ha adicionado 5 gotas de agua destilada estéril
2. Agitar el frasco manualmente durante uno o dos minutos y agregar aproximadamente 4 ml. de agua destilada estéril.
3. Agitar el tubo para homogenizar y dejar sedimentar de 30 a 60 grados segundos.
4. Con una pipeta pasteur retirar la parte homogénea y colocarla en el tubo destinado a preparar la suspensión conforme al patrón, para lo cual se va agregando agua destilada y agitando, hasta que su opacidad se ajuste a la del patrón Mc Farland No. 1 Esta es la llamada "suspensión madre".
5. A partir de la suspensión madre se prepararan seis nuevas suspensiones en escala decimal ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ )
6. Las suspensiones decimales se hacen tomando 1 ml de la suspensión madre y mezclándolo con los 9 ml de agua destilada del primer tubo, es decir el rotulado 10-1
7. Se continua así sucesivamente hasta prepara las seis diluciones.
8. Finalmente sembrar las diluciones ( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) en forma parada con y sin antituberculosos los dos diferentes medios (L-J y TL7H11).



## XII.- VARIABLES:

NOMBRE DE LA VARIABLE:	DEFINICIÓN CONCEPTUAL:	DEFINICIÓN OPERACIONAL:	CATEGORIA:	ESCALA:
Bacilo ácido alcohol resistente (BAAR)	Bacteria en forma de bastoncillo identificado por la tinción de Ziehl-Neelsen	Negativo: no BAAR + : 3-9 BAAR en todo el frotis ++: 10 o > BAAR en todo el frotis +++ : 1 BAAR por campo	BAAR (-), BAAR (+), BAAR (++) , BAAR(+++).	Ordinal.
Löwestein-Jensen	Medio de cultivo disponible para recuperar micobacterias compuesto a base de huevo y sales minerales usado por los laboratorios clínicos.	Positivo: crecimiento de la micobacteria Negativo: no se observa crecimiento de la micobacteria. Contaminado: crecimiento de otro microorganismo diferente a la micobacteria.	Positivo o negativo	Nominal
Microcultivos, agar de capa delgada TL7H11	Se trata de un liofilizado al que se adicionaran los antituberculosos antes de la coagulación del medio para la prueba de drogosusceptibilidad	Positivo: crecimiento de la micobacteria Negativo: no se observa crecimiento de la micobacteria. Contaminado: crecimiento de otro microorganismo diferente a la micobacteria.	Positivo o negativo.	Nominal.

Método de proporciones	Es un método para el estudio de drogasusceptibilidad que consiste en determinar la proporción de mutantes resistentes para cada medicamentos presentes en la cepa se emplea L-J sólo y adicionado con los medicamentos en estudio. Permitiendo conocer el número total de la población bacilar sembrada con el primero y observar el número de mutantes resistentes.	Observar la falta de crecimiento del bacilo en el medio adicionado con el fármaco a estudiar	Sensible o resistente	Nominal.
Tiempo de crecimiento de <i>M. tuberculosis</i>	Tiempo que va desde la siembra de la muestra hasta la identificación macroscópica de la colonias en el medio de cultivo.	Tiempo en días de la siembra hasta la identificación de las colonias.	Se reportará en números absolutos	Razón
Edad	Tiempo que ha vivido una persona desde su nacimiento	Los años cumplidos que refiere el paciente al momento de ser incluido en el estudio.	Se reportará en números absolutos.	De razón

VARIABLE	DEF. CONCEPTUAL	DEF. OPERACIONAL	CATEGORIA	ESCALA
RADIOGRAFÍA DE TÓRAX	Imagen que se imprime en una placa por acción de rayos x, en proyecciones postero-anterior el paciente es instruido para realizar una inspiración profunda	Evaluaremos imágenes en una radiografía postero-anterior de tórax	Normal, nódulos, foco neumónico único, foco neumónico múltiple, adenopatías hiliares, derrame pleural, cavitación unilateral, bilateral, miliar, intestinal, nódulos, atelectasia.	Nominal
SEXO	Condición biológica que diferencia al macho de la hembra.	Características fenotípicas del paciente	Masculino o femenino	Nominal
PESO	Fuerza de gravitación ejercida por algún astro.	Peso en kilogramos	Será reportado en números absolutos	Razón
OCUPACIÓN	Modo para adquirir propiedades.	Oficio	Desempleado, campesino, obrero, empleado, comerciante, profesionista.	Nominal
PÉRDIDA DE PESO	Número de kilogramos perdido durante la enfermedad	Número de kilogramos perdido durante la enfermedad	Será reportado como sin pérdida ponderal, mayor o menor a 10kgs.	Nominal

COMBE	Convivencia por más de 8 semanas con portador de tuberculosis pulmonar.	Convivencia por más de 8 semanas con paciente portador de tuberculosis.	Se ignora, si o nó.	Nominal
ESCOLARIDAD	Grado educativo cursado hasta el momento de estudio	Grado educativo cursado hasta el momento de estudio	Analfabeta, primaria incompleta, secundaria, bachillerato, licenciatura, postgrado	Nominal
ALCOHOLISMO	Frecuencia en la ingesta de bebidas alcohólicas	Frecuencia en la ingesta de bebidas alcohólicas	Diario, 2 ó más veces por semana, cada semana, 2 veces por semana, cada mes	Nominal
CÓMORBILIDAD	Enfermedad coexistente y que predispone a la tuberculosis	Enfermedad coexistente y que predispone a la tuberculosis	Ninguna, Diabetes mellitus tipo 2, Insuficiencia renal crónica, enfermedades autoinmunes, inmunosupresores neoplasias, SIDA.	Nominal.
TOS	Movimiento ruidoso del aparato respiratorio	Movimiento ruidoso del aparato respiratorio con duración mayor a 4 semanas	Sin tos, tos seca, tos con expectoración mucosa, mucopurulenta, hemoptoicos, hemoptisis.	Nominal
DIAFORESIS	Sudoración intensa.	Sudoración intensa de predominio vespertino y/o nocturno.	No, si.	Nominal.
LOCALIZACIÓN RADIOGRÁFICA	Localización de lesiones tuberculosas en la radiografía de tórax	Localización de lesiones tuberculosas en la radiografía de tórax	Lóbulo superior derecho (LSD), Lóbulo superior izquierdo (LSI), Lóbulo medio (LM), Lóbulo Inferior	Nominal

			derecho (LID), Lóbulo Inferior Izquierdo (LII), Difuso.	
--	--	--	--	--

**XIII. BIBLIOGRAFÍA:**

- 1) Sudre P, Ten Dam G, Chan C, Kochi A. Tuberculosis in the present time: a global overview of the tuberculosis situation. A global overview of the tuberculosis. Situation. Geneva: World Health Organization;1991. (Document WHO/TUB/91.158).
- 2) Hamburg MA, Frieden TR. Tuberculosis transmission in the 1990. *N Engl. Med* 1994;330:1750-51.
- 3) Glassroth J et al: tuberculosis in the 1980 *N. Engl. J. Med.* 302:1441, 1980
- 4) American Thoracic society: Treatment of tuberculosis infection in adults and children. *Am Rev. Respir. Dis.* 1990;134:355;
- 5) World Health Organization report on TB epidemic. Global TB programme. Geneva: The Organization; 1997.
- 6) Barnes P, Blotch AB, Davidson BT, Snyder Jr. DE. *N. England Journal Med.* 1991;324:1644-50.
- 7) Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica EPIDEMIOLOGIA No 52, Vol 17, Sem 52,2000
- 8) Salfinger M, Pfyffer GE. The new diagnostic mycobacteriology Laboratory. *Eur J Clin microbiol Infec Dis* 1994;13:961-79.
- 9) Tuberculosis 1996.(Serial online) EPI-NEWS 1997;week 34. Available from:<http://www.ssi.dk/dk/epi-nyt/1997/uge34.html>(accessed Sept 1,2000)
- 10)Pottumarthy S. Morris. AJ, Harrison AC, Wells VC. Evaluation of the tuberculin gamma interferon assay: potential to replace the mantoux skin test. *J. Clin Microbiol* 1999;37:3229-32.
- 11)Vestal, A.L. and G.P. Kubica, 1965.Differential colonial characteristics of mycobacteria on Middlebrook and Cohn 7H10 agar-base medium. *Am. Rev. Respir. Dis.*1994:247-52.

- 12) Cummings S, D.M., D. Ristroph, E. E. Camargo, S.M. Larson, and H.N. Wagner, Jr. 1975. Radiometric detection of the metabolic activity of mycobacterium tuberculosis J. Nucl. Med. 16:1189-91.
- 13) Allerberger F, Fille m, Dierich M P. To the editors. Clinic Microbiol. Newslett 1993;15:191-2.
- 14) Margie A. Morgan, at cols. Comparison of a Radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of Mycobacterium from smear-negative specimens J. Clin. Microbiol. 1983;18:384-8.
- 15) Gardiner David F., Beavis G. Kathleen Laboratory Diagnosis of mycobacterial Infections. Seminars in Respiratory Infections, 15:2:2000,132-43
- 16) Andersen P, Munk M E, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. The Lancet 2000;356:1099-104
- 17) Rajalahti I, Vourinen P, Nieminen MM, Miettinen A. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in sputum specimens by The automated Roche cobas amplicor Mycobacterium tuberculosis test. J. Clin. Microbiol 1998;36:957-8.
- 18) Shibayama H, Galván F. J. Contreras C. Microcultivo en medio bifásico con laminilla siliconada para el aislamiento de Mycobacteria. Bol. Oficina Sanit Panam 1996;120:275-81
- 19) Runyon E H. Identification of mycobacteriology pathogens utilizing colony characteristics. Am. J. Clin. Pathol. 1970;54:578-86.
- 20) Welch D F, Guruswamy A P, Sides S J, Charles H S, Gilchrist M J. Timely culture for mycobacteria wich utilizes a microcolony method. J. Clin Microbiol 1993; 31:2178-89.
- 21) G.I. Mejía, Castrillon L, et cols. Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. Int J. Tuberc. Lung Dis 1999;3(2):138-42.

- 22) Tenover, F.C.J.T. Crawford, R.E. Huebner, L.J. Geiter, C.R. Horsburgh, Jr., and R.C. Goo. 1993. The Resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J. Clin. Microbiol.* 31:767-70.
- 23) Hawkins, J.E., R.J. Wallace, Jr and B.A. Brown. 1991. Antibacterial susceptibility test: mycobacteria, p.1138-1152. In A. Balows, W.J. Hausler, JR., K.L. Herrmann, H.D. Isenber. And h.Shadommy (ed.), *Manual of clinical microbiology* 5th ed. American Society microbiology, Washington, D.C.
- 24) Diaz-Infantes María, Ruiz-Serrano María, Martínez Sánchez Lucía, Evaluation of the MB/BacT Mycobacterium Detection System for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* *The Journal of clinical Microbiology* May 2000. 1988-9
- 25) Centers for Disease Control: Tuberculosis morbidity United States 1995. *MMWR Morb Mortal Wylt Rep* 1997,46:695-9.
- 26) Centers for Disease Control: Tuberculosis morbidity United States 1995. *MMWR Morb Mortal Wylt Rep* 1996,45:365-70,.
- 27) Griffith David E. Et al. Mycobacteria as pathogens of respiratory infection 1998;3:12 593-611.
- 28) Herrera M, Plancarte L, Anzaldo G, et al. Resistencias primarias en 126 casos de tuberculosis pulmonar. *Salud Pública de México* 1976;XVIII(1):111-4.
- 29) Plancarte L, Anzaldo G, Balandrano S. Resistencia primaria del *Mycobacterium tuberculosis*. *Salud Pública de México*. 1982;XXIV(3):321-7
- 30) Olvera R., Pérez L. Resistencia secundaria en tuberculosis. *Rev. Inst. Nat. Enf. Resp. Méx.* 1993;6(4):185-90
- 31) Sifuentes J. Ponce L, Camacho F, et al. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes mexicanos. *Rev. Inv. Clin.* 1995;47:27-81.



- 32)García García, María, Ponce de León, Jiménez et al. Clinical consequences and transmissibility of Drug-Resistant Tuberculosis in Southern Mexico, Archives of Internal Medicine 2000;1-60:630-6.

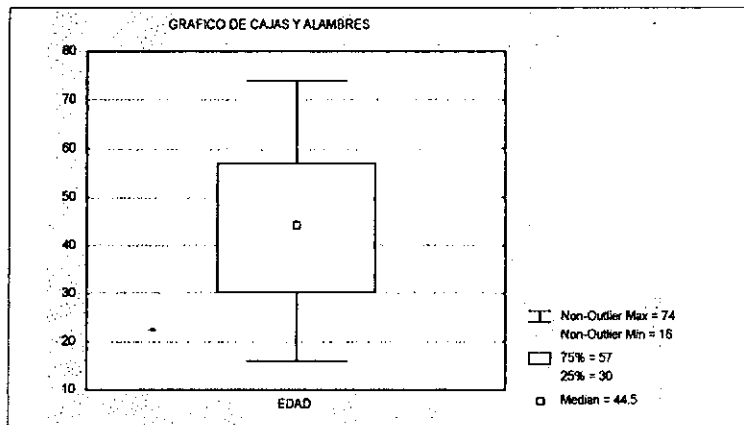
#### XIV.- ANALISIS DE LOS DATOS.

Se realizó un análisis exploratorio de las variables en estudio para observar el comportamiento y distribución de los pacientes, presentaremos las variables de interés para el proyecto. Los resultados estadísticos serán corridos en el paquete STATISTICA 2001, con una confiabilidad del 95%.

La mayoría de los datos se encuentran en una escala ordinal y nominal.

#### XV.- RESULTADOS:

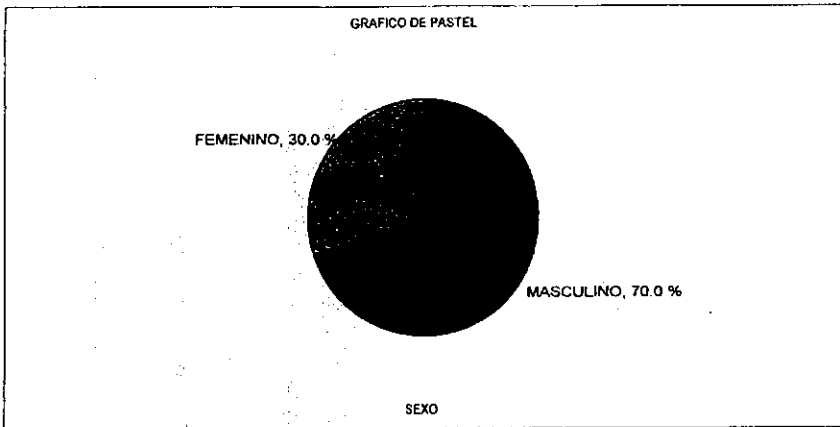
##### VARIABLE: EDAD



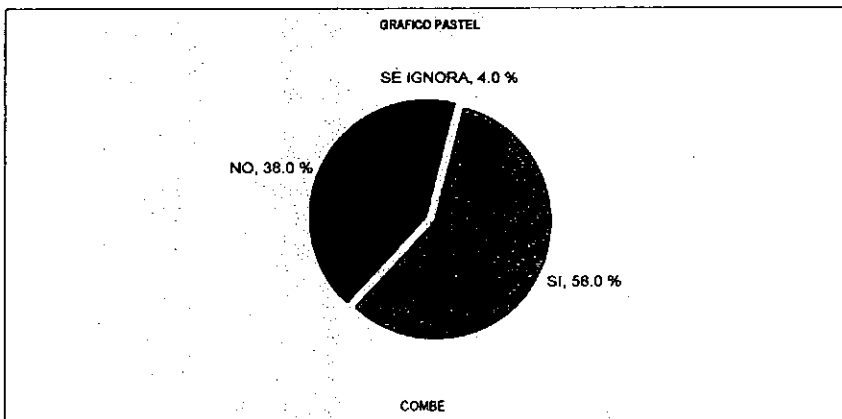
##### ESTADISTICAS DESCRIPTIVAS DE EDAD

N	Media	Mínimo	Máximo	Desv. Est.
50	42.68	18	74	14.84

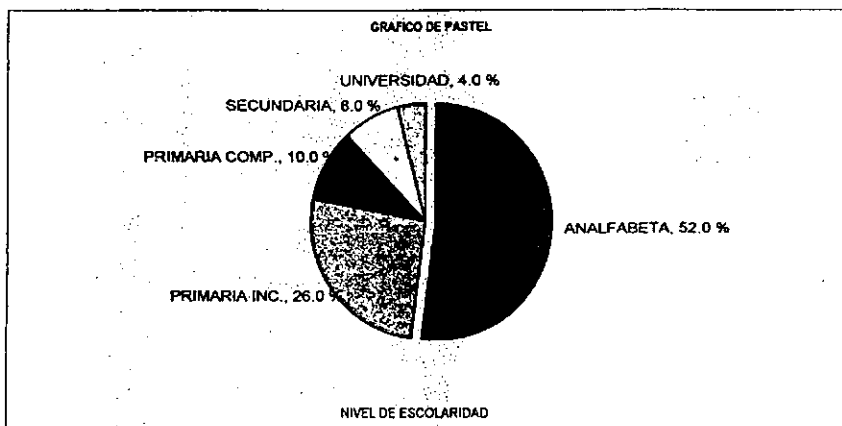
Observamos en la gráfica de cajas y alambres, que 37 pacientes (75%) de la edad de los pacientes oscilan entre los 30 y 57 años la edad con una edad máxima de 74 años y una edad mínima de 18 años respectivamente, y una edad promedio de 43 años.

**VARIABLE: SEXO**

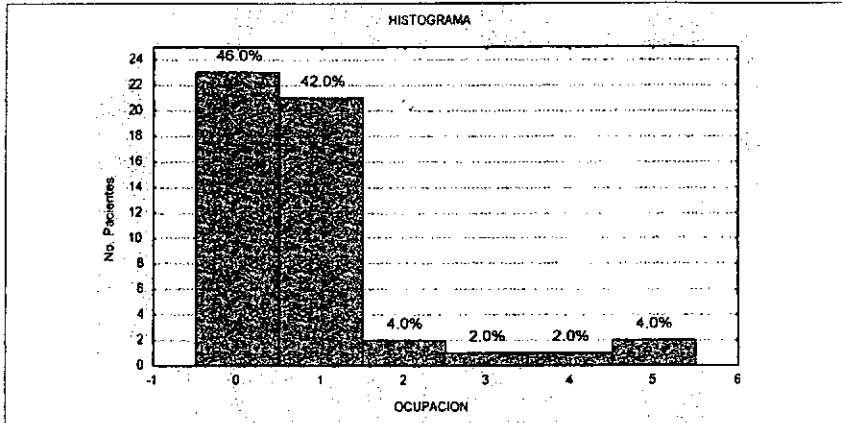
En la gráfica de pastel observamos que en 37 ( 70%) del total de pacientes estudiados corresponde al sexo masculino contra 23 pacientes (30%) que corresponde al sexo femenino.

**VARIABLE: COMBE**

La figura anterior nos ilustra que el 58% (29 pacientes) de los pacientes tienen combe positivo contra el 30% (15 pacientes) combe negativo y en el 4% (6 pacientes) se ignora.

**VARIABLE: ESCOLARIDAD**

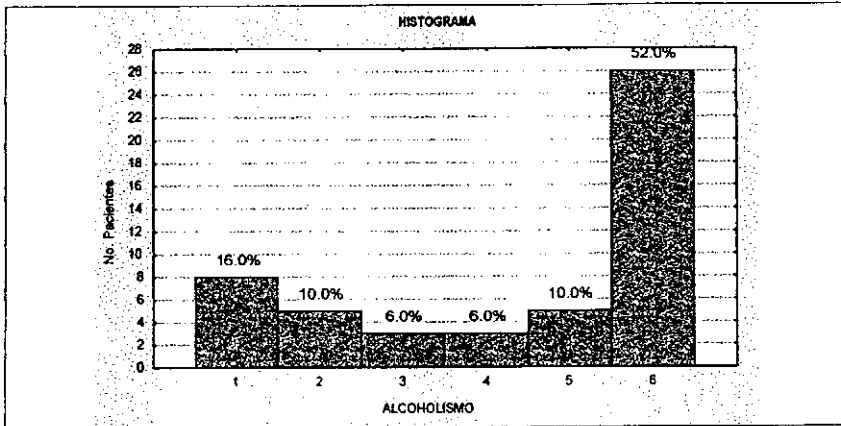
Observamos en la gráfica de pastel el grado de escolaridad, predominante en los sujetos del proyecto de investigación. Destacando en el 52% (26 pacientes) de los casos el analfabetismo, 26% (13 pacientes) primaria incompleta, 10% (5 pacientes) primaria completa, secundaria en el 8% (4 pacientes), estudios universitarios en 4% (2 pacientes).

**VARIABLE: OCUPACION.**

No.	DESCRIPCION
0	RECLUSO
1	CAMPESINO/PESCADOR
2	OBrero
3	EMPLEADO
4	COMERCIANTE
5	PROFESIONISTA

Con respecto a la ocupación de los pacientes el 46% (23 pacientes) fue recluso, la ocupación que le sigue es campesino con un 42% (21 pacientes) Cabe mencionar que la Ocupación y el Nivel Cultural están correlacionadas.

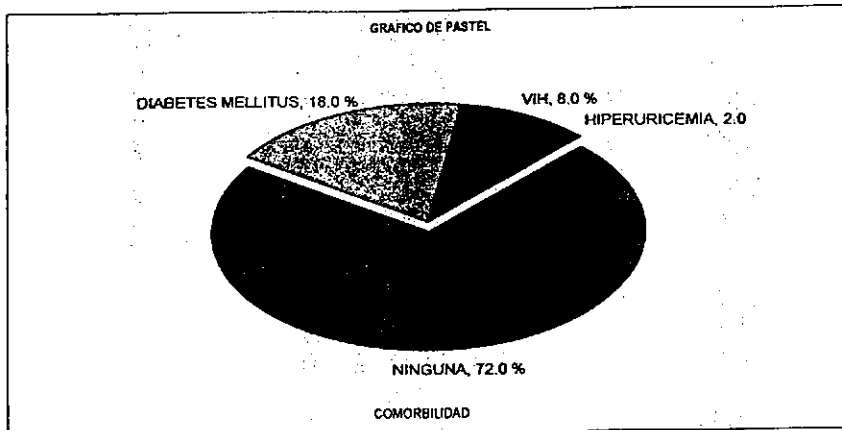
## VARIABLE: ALCOHOLISMO.



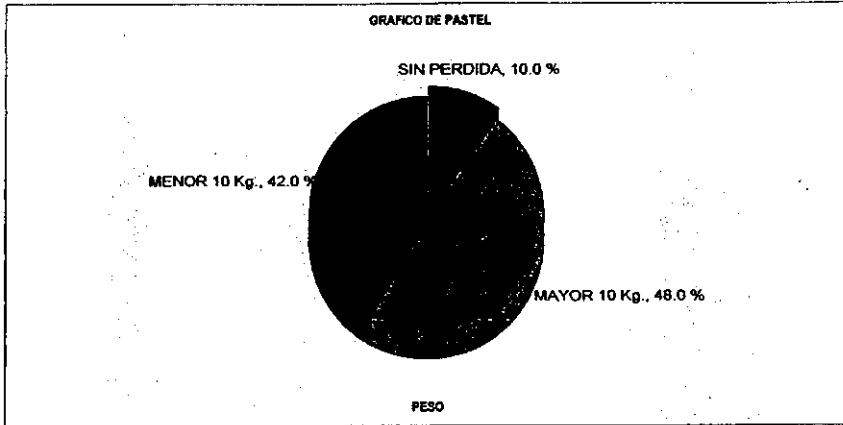
No.	DESCRIPCION
1	DIARIO
2	DOS A TRES VECES P/SEMANA
3	CADA SEMANA
4	DOS VECES P/MES
5	CADA MES
6	NEGADO

En el Histograma observamos claramente que el 52% (26 pacientes) del total de pacientes estudiados niegan alcoholismo contra el 16% (8 pacientes) con etilismo diario.

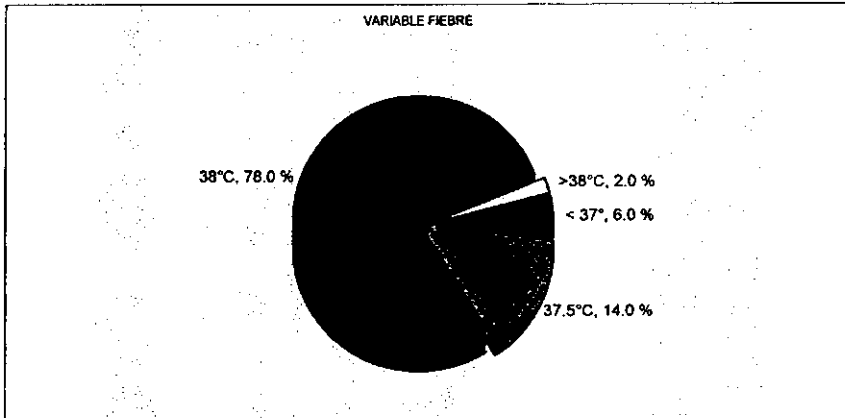
## VARIABLE: COMORBILIDAD.



Observamos que la tuberculosis no se asocia con alguna enfermedad en particular en el 72% (36 pacientes), destaca la coexistencia de la Diabetes Mellitus con la tuberculosis pulmonar en un 18% (9 pacientes) y la infección por VIH en el 8% (4pacientes).

**VARIABLE: PESO**


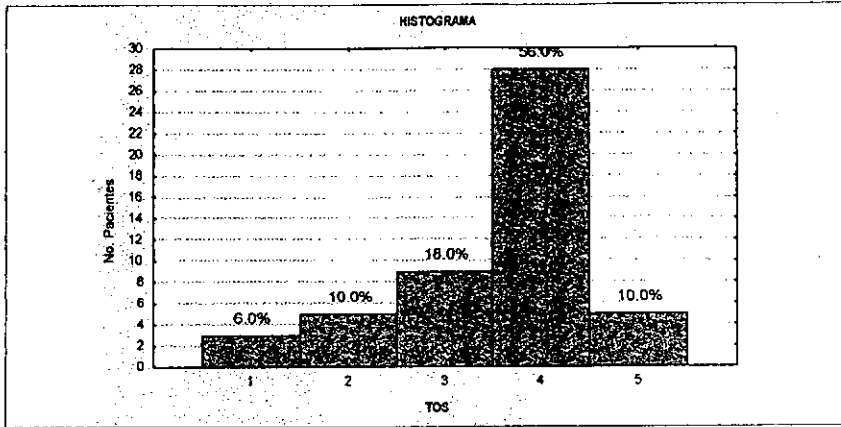
La mayoría de los pacientes han perdido más de 10 kgs de peso en el 48% (24 pacientes) contra el 42% (21 pacientes) que ha perdido menos de 10Kg y en 5 pacientes (10%) no hubo pérdida ponderal.

**VARIABLE: FIEBRE**


De los pacientes estudiados un 78% (39 pacientes) presentaron Fiebre (38°C) seguido de Febrícula (37.5°C) en un 14% (7 pacientes).

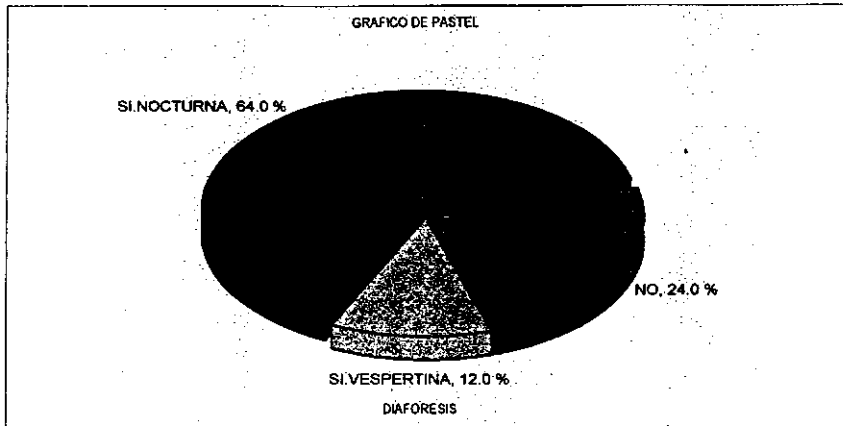


## VARIABLE: TOS

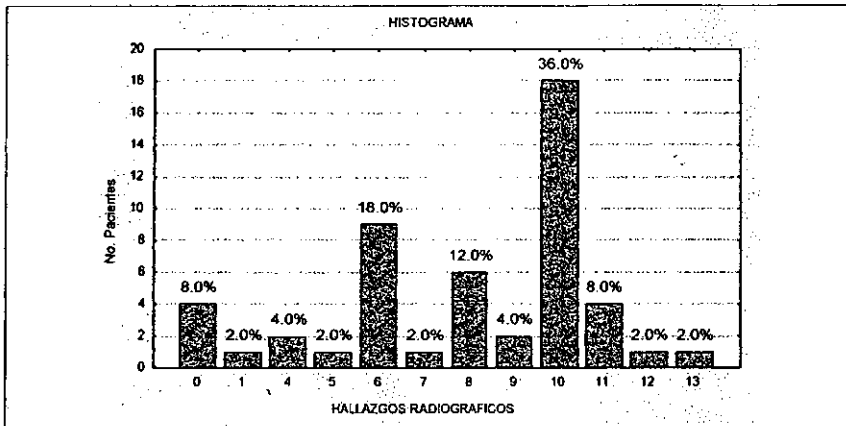


No.	Descripción.
1	TOS SECA
2	TOS EXP. MUC.
3	TOS EXP. MUCUP.
4	HEMOPTOICOS
5	HEMOPTISIS

Observamos en el histograma que el 56% (28 pacientes) de los pacientes tienen hemoptoicos, seguidos de tos con expectoración mucopurulenta en el 18% (9 pacientes), seguidos del 10% (5 pacientes) tos con expectoración mucosa y hemoptisis.

**VARIABLE: DIAFORESIS.**

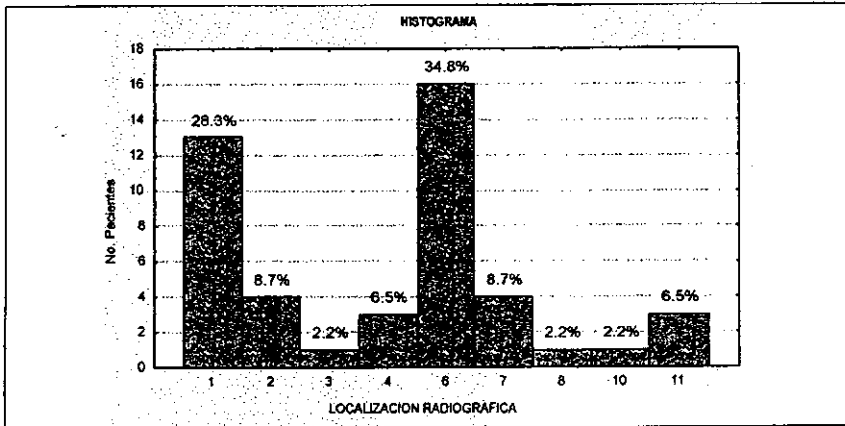
De acuerdo a la gráfica la mayoría de los pacientes tiene diaforesis nocturna 64% (32 pacientes), vespertina en el 12% (6 pacientes), y sin diaforesis en el 24% (12 pacientes).

**VARIABLE: HALLAZGOS RADIOGRAFICOS.**

No.	Descripción.
0	SIN RADIOGRAFIA
4	ADENOPATIAS HILIARES
5	DERRAME PLEURAL
6	CAVITACIONES UNILATERALES
7	CAVITACIONES BILATERALES
8	MILIAR
9	INTERSTICIAL
10	MICRONODULOS
11	ATELECTASIA
12	MACRONODULOS
13	MAS DE 1 CARACT. RADIOLOG.

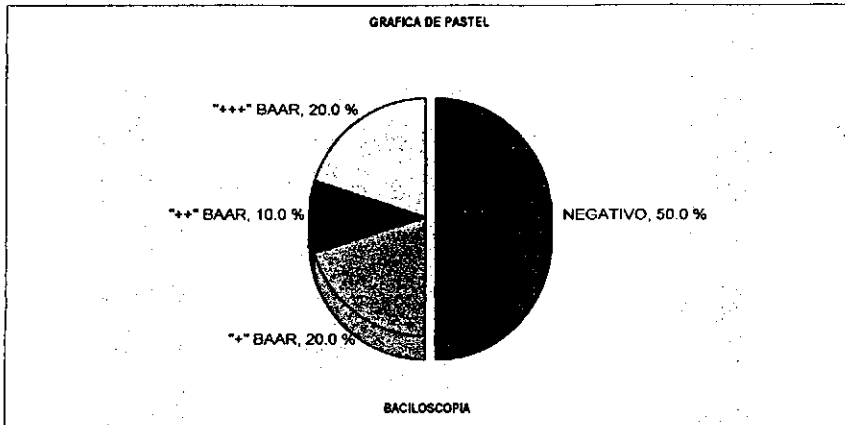
En el Histograma se observa como hallazgo radiográfico más frecuente el patrón micronodular en un 36% (18 pacientes), seguido de cavitación unilateral en un 18% (9 pacientes), el patrón miliar en el 12% (6 pacientes).

## LOCALIZACIÓN RADIOGRÁFICA:



No.	Descripción.
1	LSD
2	LSI
3	LM
4	LID
6	DIFUSO
7	LSD Y LSI
8	LID/LII
9	PARAHILIAR DERECHO
10	PARAHILIAR IZQUIERDA
11	LSD Y DIFUSO

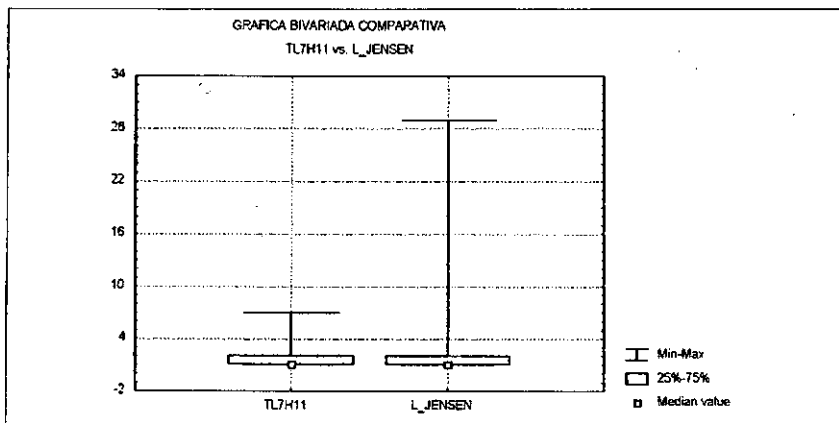
La localización radiográfica más frecuente correspondió al Difuso con 34.8% (17 pacientes) seguida de la localización en el lóbulo superior derecho con 28.3% (14 pacientes), el 8.7% (4 pacientes) del total se localizó en el lóbulo superior izquierdo y en ambos (LSD/LSI) en 5 pacientes.

**VARIABLE: BACILOSCOPIA**

En la gráfica anterior observamos que el 50% (25 pacientes) de los pacientes tuvo BAAR positivo comparados con 50% (25 pacientes) BAAR negativo.

## ESTADISTICO DE PRUEBA PARA LA HIPÓTESIS.

De los 50 pacientes sólo uno obtuvo el desarrollo bacteriano indispensable y necesario para la comprobación de la hipótesis en estudio.



FARMACOS	TL7H11	L- JENSEN
ISONIAZIDA	S	S
RIFAMPICINA	R	R
ETAMBUTOL	S	S
ESTREPTOMICINA	S	S
TIEMPO CRECIMIENTO	7	29

Para ambos métodos en el experimento no existe suficiente evidencia para decir cual de los dos es el más viable, debido al tamaño de muestra de  $n=1$  en el análisis.

## XVI.- DISCUSIÓN:

Los resultados de este estudio muestran que de los 50 pacientes con alta sospecha de tuberculosis pulmonar se corroboró la enfermedad por baciloscopia en el 50% (25 pacientes), esto correlaciona con la bibliografía en donde se menciona que el porcentaje de baciloscopias negativas, en pacientes con enfermedad activa, oscila entre 50 y 60%. Otros autores mencionan que la sensibilidad varía de 22 a 65% (8)

De los pacientes estudiados únicamente 1 cultivo (2%) tuvo crecimiento bacteriano, esto podría ser explicado por lo siguiente; en 27 pacientes (54%) de los 50 pacientes hubo tratamiento previo o se encontraban en tratamiento antituberculoso y aunque la baciloscopia se negativiza al 2º mes una vez iniciado el tratamiento, la micobacteria pierde el poder replicativo por lo que no hay crecimiento en cultivos, La baciloscopia es positiva a pesar de que la micobacteria esté muerta, lo cual puede explicar la falta de crecimiento en los cultivos. Por otro lado en el 10 a 20% de los casos no hay crecimiento del bacilo en los medios de cultivo. (9,10).

Es importante mencionar que en este estudio el tiempo de crecimiento del cultivo de la micobacteria tuberculosis en los dos medios, (Middlebrook 7H11 y Löwestein-Jensen) varió de un medio a otro de 7 a 29 días, concordando con la bibliografía. El agar de capa delgada con medio de Middlebrook 7H11 (TL7H11) permite una identificación más temprana de micobacterias y varía desde 1 a varias semanas (21).

Es relevante como resultado del estudio observar que hubo crecimiento en el medio Middlebrook 7H11 para estudio de drogoresistencia, en menor tiempo que el que se tiene con el estándar Löwestein Jensen. Esto hace que a pesar de ser un estudio con un tamaño de muestra muy pequeño, sean relevantes los resultados y sirva para estudios posteriores.

Por otro lado para los medios de cultivo Middlebrook 7 H11 en agar de capa delgada y el medio Löwestein-Jensen, en el proyecto no existe suficiente evidencia para decir cual de los dos es mejor, debido al tamaño de muestra de n=1 en el análisis a pesar de las limitaciones en el estudio. Es necesario realizar un estudio con un tamaño de muestra mayor enfocados a los cultivos de los pacientes.

**CONCLUSIÓN:**

En este estudio se corrobora que la positividad de la bacislocopia en nuestro medio es similar a la reportada por la literatura. Respecto a la comparación del crecimiento del bacilo tuberculoso en los dos medios de cultivo utilizados no es posible obtener conclusiones puesto que sólo contamos con un cultivo positivo para ambos medios. La causa probable de la ausencia de crecimiento en el resto de los pacientes puede ser multifactorial, pero principalmente por la posibilidad de que en la mayoría de los casos las micobacterias podrían estar muertas; no descartamos el error en el procesamiento de las muestras.



**XIX.- ANEXOS.****HOJA PARA RECOLECCIÓN DE DATOS**

Nombre \_\_\_\_\_  
 Institución \_\_\_\_\_  
 Número de expediente \_\_\_\_\_  
 Edad \_\_\_\_\_  
 Sexo \_\_\_\_\_  
 Domicilio \_\_\_\_\_

**Antecedentes**  
**Combe:**

Escolaridad: 0) Analfabeta  
 1) Primaria incompleta.  
 2) Primaria completa  
 3) Secundaria.  
 4) Bachillerato.  
 5) Licenciatura  
 6) Post-grado

**Ocupación:**

0) Desempleado  
 1) Campesino.  
 2) Obrero.  
 3) Empleado  
 4) Comerciante  
 5) Profesionista.

**Alcoholismo:**

0) Diario.  
 1) 2 ó 3 veces por semana  
 2) Cada semana  
 3) 2 veces por mes.  
 4) Cada mes

**Comorbilidades**

0) Negativo  
 1) DM  
 2) IRC  
 3) Enfermedades autoinmunes      Cuál \_\_\_\_\_  
 4) Terapia inmunosupresora      Tipo \_\_\_\_\_  
 5) Neoplasia  
 6) VIH

**Tuberculosis previa**

a. Tratamiento  
 0) Ninguno  
 1) Supervisado  
 2) Autoadministrado

## c. Antituberculosos secundarios

- 0) Ninguno
- 1) CPX
- 2) Clotazimina
- 3) Tiacetazona
- 4) Cicloserina
- 5) Etonamida
- 6) Amikacina
- 7) Kanamicina
- 8) Ciprofloxacino.
- 9) Ofloxacino.
- 10) PAS.

## Duración del tratamiento

- 0) Menos de 6 meses
- 1) 6 meses.
- 2) 9 meses.
- 3) 12 meses.
- 4) 18 meses.
- 5) 24 meses.

## Tuberculosis actual

## a. Manifestaciones clínicas

- 0) Ninguna
- 1) Fiebre ( $>38^{\circ}\text{C}$ )
- 2) Pérdida de peso
  - a.  $< 10\%$
  - b.  $> 10\%$
- 3) características de la tos.
  - a. - sin tos.
  - b. - tos seca.
  - c. - tos con expectoración mucosa.
  - d. - hemoptoicos.
  - e. - Hemoptisis.
- 4) Diaforesis.
  - a. - no.
  - b. - si vespertina.
  - c. - si nocturna

## b. Hallazgos a la exploración física

## Síndrome pleuropulmonar

- 1) Si Cuál \_\_\_\_\_
- 2) No

## c. Hallazgos radiológicos

1. No RxTx
2. Normal
3. Foco neumónico único
4. Foco neumónico múltiple
5. Adenopatías hiliares
6. Derrame pleural
7. Cavitaciones unilateral
8. Cavitaciones bilaterales
9. miliar
10. Intersticial
11. Nódulos
12. Atelectasia.

## d. Localización en RxTx

- 1) LSD
- 2) LSI
- 3) LM
- 4) LID
- 5) LIJ
- 6) DIFUSO
- 7) LSD/LSI

## Diagnóstico

## d. Resultados de baciloscopia

1. Negativo
2. +
3. ++
4. +++

## e. Cultivo de TL7H11

- 1) Positivo
- 2) Negativo

## f. Cultivo de L-J

- 1) Positivo
- 2) Negativo

g. Tiempo de crecimiento en TL7H11 \_\_\_\_\_ días

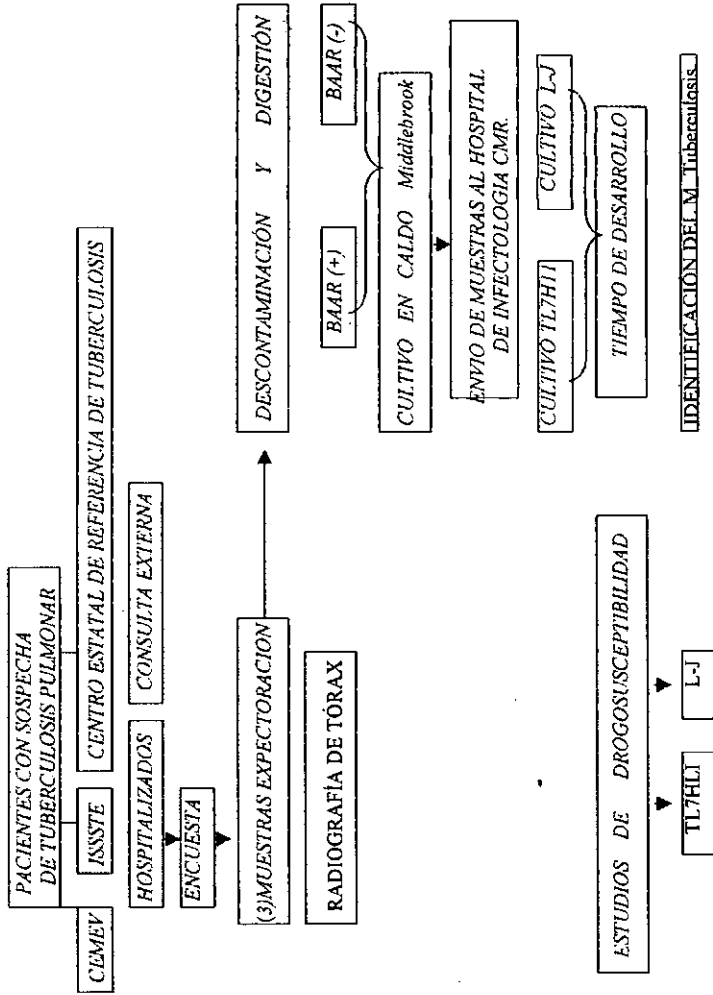
h. Tiempo de crecimiento en L-J \_\_\_\_\_ días

## Pruebas de drogosusceptibilidad

- 1) Susceptible (S)
- 2) Resistente (R)

Drogas	TL7H11	L-J	BACTEC
Isoniacida			
Rifampicina			
Etambutol			
Estreptomina			

# FLUJOGRAMA



CEMEV Centro de Especialidades. Médicas del estado de Veracruz HIM  
 Hospital Dorantes Muza HICMR Hospital de Infectología Centro Médico la Raza  
 L-J Löwestein Jensen