

2 Ej No. 47



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

"AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL  
GENERO MYCOBACTERIUM A PARTIR DE EXPECTO-  
RACIONES."

**T E S I S**

Que para obtener el Título de  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P r e s e n t a

**MARIA TERESA LAURA GUERRERO RUIZ**



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.

"AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GENERO  
MYCOBACTERIUM A PARTIR DE EXPECTORACIONES"

C O N T E N I D O

	Pág.
Introducción	1
Generalidades	
a) Taxonomía y morfología	3
b) Características diferenciales de las <u>Mycobacteria</u>	3
b.1) Composición química de la pared celular	
b.2) Composición de lípidos	
b.3) Producción de pigmentos	
b.4) Acido-resistencia	
c) Requerimientos nutricionales	8
c.1) Fuentes de carbono y nitrógeno	
c.2) Asimilación de fierro	
d) Clasificación	10
d.1) Clasificación de Runyon	
d.2) Clasificaciones Adansonianas	
d.3) Clasificación actual	
e) Importancia clínica de la tuberculosis	16
e.1) Enfermedad	
e.1.1.) Tuberculosis de infección primaria	
e.1.2.) Tuberculosis secundaria	
e.2) Especies del género <u>Mycobacterium</u> implícitas en la tuberculosis pulmonar	
e.3) Tratamiento	
e.4) Epidemiología y control de la tuberculosis en México	
f) Diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis	35
f.1) Recolección de muestras	
f.2) Descontaminación y concentración de las muestras	
f.3) Tinción y examen microscópico de bacilos ácido-alcohol resistentes	
f.4) Medios de cultivo	
f.5) Incubación de los cultivos	
f.6) Identificación de las <u>Mycobacteria</u>	
f.7) Medidas de seguridad	
Parte experimental	48
a) Material	
b) Equipo	
c) Reactivos	
d) Medios de cultivo	
e) Técnicas empleas	
Resultados	58

<b>Análisis de Resultados</b>	<b>77</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>81</b>
<b>Anexo</b>	<b>84</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>88</b>

## INTRODUCCION

Durante este siglo, la incidencia de la tuberculosis ha declinado en los países desarrollados como resultado de los grandes esfuerzos de investigadores, clínicos y trabajadores de salud pública. Desafortunadamente, esta tendencia no se ha seguido en muchas otras partes del mundo a pesar de que la tuberculosis es una enfermedad controlable y curable, por lo cual se ha catalogado a esta enfermedad con justa razón, como un defecto en la conciencia de la comunidad mundial.

La incidencia exacta de la tuberculosis en el mundo es desconocida, pero se ha estimado que se presentan cerca de 7 millones de casos cada año, y cerca de 5,000 defunciones diarias debidas a ella. Por otro lado, cada minuto 10 personas desarrollan la enfermedad y 3 mueren (12).

La tuberculosis en nuestro país continúa como un padecimiento endémico sumamente importante, constituyendo un grave problema de salud pública (26). En 1975 ocupó el décimo primer lugar entre las causas de defunción. La enfermedad predomina en personas mayores de quince años, lo cual tiene una gran trascendencia económica-social, pues ataca sujetos en la época más productiva de su vida. Los datos obtenidos en México durante 1978 por el Grupo Coordinador Interinstitucional para el Estudio de la Tuberculosis y Enfermedades del Aparato Respiratorio, confirman la magnitud de la tuberculosis como problema de salud pública (26).

En nuestro país se considera que el agente causal más importante de tuberculosis es M. tuberculosis, y en segundo lugar M. bovis, aunque en mucho menor proporción.

Fue hasta mediados de este siglo cuando se comenzó a dar importancia a las micobacterias atípicas como causantes de enfermedad en el hombre (39). Actualmente, en los países desarrollados, las micobacterias

atípicas ocasionan cuadros clínicos de tuberculosis semejantes a los producidos por M. tuberculosis y M. bovis (11,14,30,34,36,42). Así, M. kansasii y M. avium-intracellulare han adquirido importancia como causantes de enfermedad pulmonar crónica semejante a la tuberculosis (11,14 34,36,42). Se conocen también casos debidos a M. scrofulaceum (13,34) y al complejo M. fortuitum-chelonei (11,33,34,36).

Las manifestaciones clínicas de enfermedades por M. tuberculosis y otras especies de micobacterias son similares.

En virtud de que en la mayoría de los laboratorios el diagnóstico de este padecimiento se establece sólo por los resultados de baciloscopia, en el presente trabajo se tratará de establecer si en nuestro país el número más considerable de casos de tuberculosis son producidos por M. tuberculosis, o si intervienen como causa del padecimiento algunas micobacterias atípicas, que son resistentes en forma natural a los fármacos antituberculosos, considerando que de ser así, se aclararían en parte los fracasos en el tratamiento y manejo de los pacientes tuberculosos.

## GENERALIDADES

## a) Taxonomía y Morfología:

Clase - Schizomycetes

Orden - Actinomycetales

Familia - Mycobacteriaceae

Género - Mycobacterium

El género Mycobacterium comprende cerca de 30 especies que, a excepción de M. tuberculosis y probablemente M. leprae, se encuentran en el medio ambiente como saprófitos, pudiendo aislarse de diversas fuentes que incluyen suelo, heces animales y humanas, agua, vegetación, piel, etc.

Microscópicamente se observan como bastones rectos o ligeramente curvos de 0.2 a 0.6 X 1.0 a 10  $\mu$ m. Son aerobios, no presentan cápsula, esporas, pilis o flagelos.

Una característica importante del género es la capacidad que presentan las células bacterianas de resistir la decoloración con alcohol-ácido después de haber sido teñidas con fucsina básica. Esta propiedad llamada ácido-resistencia no es única de las Mycobacteria y no es siempre suficiente para distinguirlas de cultivos o cepas de Nocardia y Corynebacterium. El género Mycobacterium es realmente definido por otros criterios taxonómicos, particularmente la estructura antigénica y el análisis químico de la pared celular.

b) Características diferenciales de las Mycobacteria:

## b.1) Composición química de la pared celular

La pared celular micobacteriana es una estructura compleja formada

por cuatro capas (figura 1)

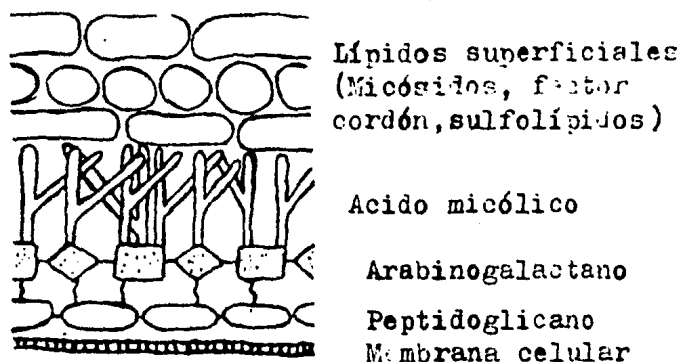


figura 1. Representación de la pared celular micobacteriana.

La estructura basal consta de un peptidoglicano unido covalentemente a un arabinogalactano-micolato. El péptidoglicano (mucopéptido o mureína) está formado de unidades repetidas de ácido N-glicolil murámico y N-acetil glucosamina unidas a un péptido. Trabajos recientes han confirmado que este grupo N-glicolil está presente en todas las Mycobacteria, Nocardiae y Micromonospora, pero ausente en Corynebacteria y Streptomyces (19). Las uniones interpéptidos son de dos clases: D-ala-meso-DAP y meso-DAP-DAP. Aproximadamente el 70% de la unión cruzada basal en el péptidoglicano se integra con puentes interpéptidos entre residuos meso-DAP. Los puentes interpéptidos de este tipo parecen presentarse sólo en las micobacterias (figura 2).

El péptidoglicano está unido al polímero de arabinogalactano por uniones fosfodiéster entre residuos de ácido murámico y una arabinosa del arabinogalactano. Aproximadamente 1% de los residuos de arabinosa del polímero está esterificado por una molécula de ácido micólico (figura 3).



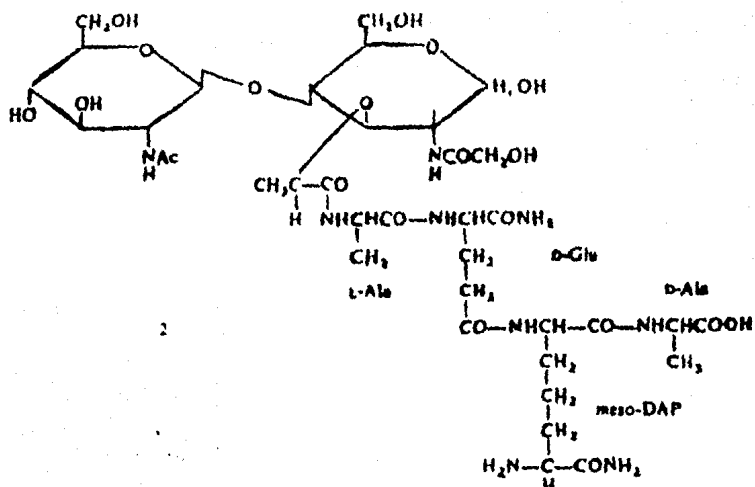


figura 2. Estructura primaria de un enlace cruzado del péptidoglicano

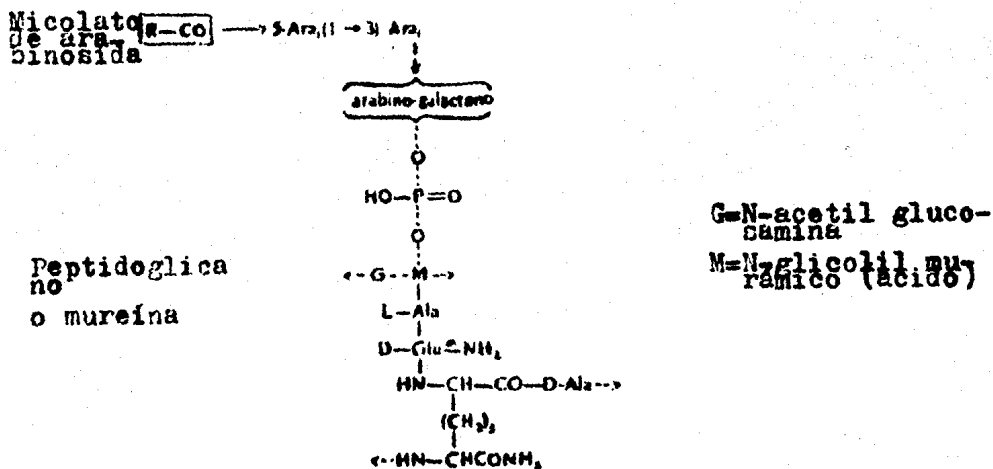


figura 3. Estructura de un monómero de la pared celular de Mycobacteria.

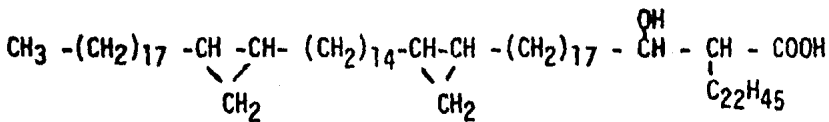
b.2) Composición de lípidos

El contenido de lípidos en Mycobacteria corresponde aproximadamente al 20-60% del peso seco de la pared. Esto es de suma importancia, ya

que los lípidos juegan un papel preponderante en la virulencia de la cepa infectante e influyen en la respuesta inmunológica a la infección, además de conferirle otras características.

Los principales lípidos encontrados en Mycobacteria son:

**Ácidos micólicos:** Estos son ácidos grasos ramificados, que se encuentran presentes en los géneros Corynebacterium, Nocardia y Mycobacterium. La diferencia en los ácidos grasos en estos géneros depende del número de átomos de carbono presentes. Así, Corynebacterium contiene de C<sub>28</sub> a C<sub>36</sub>, Nocardia de C<sub>40</sub> a C<sub>60</sub> y Mycobacterium de C<sub>60</sub> a C<sub>90</sub> (figura 4).



ácido kansamicólico

M. kansasii

C<sub>80</sub>H<sub>156</sub>O<sub>3</sub>

figura 4. Estructura de los ácidos micólicos en Mycobacteria.

**Glicolípidos:** Este grupo contiene dos de los posibles factores de virulencia: "el factor cordón" (6,6'-dimicolatotrehalosa) y los sulfolípidos. El factor cordón ha sido relacionado con la virulencia de una cepa de M. tuberculosis y su aspecto morfológico en el cultivo es en forma de cordones serpentina, constituidos de bacilos en disposiciones paralelas. Las cepas atenuadas y avirulentas crecen con un patrón al azar, en cúmulos sin esta característica orientación. Por tratamiento con el "factor cordón" puede reproducirse un cierto número de respuestas biológicas a la infección micobacteriana. También ataca a la membrana mitocondrial, provocando lesión funcional de la respiración asociado con la membrana y la fosforilación oxidativa. Sin duda, este factor desempeña un papel

crucial en la patogénesis de la infección.

Micósidos: Son un tipo específico de glicolípidos y se han descrito:

Micósido A en M. kansasii

Micósido B en M. tuberculosis

Micósido C en M. bovis

No se ha determinado ningún efecto tóxico o propiedad antigénica a los micósidos (19).

Otros lípidos: La cera D, que se ha mencionado como un lípido, en realidad es una subunidad compleja de la pared celular, y es de especial interés debido a su capacidad para actuar como adyuvante (19).

### b.3) Producción de pigmentos

Muchas micobacterias producen pigmentos, ya sea que se encuentren en la obscuridad o que sean expuestas a la luz, lo cual sirvió de base para la clasificación propuesta por Runyon en 1959.

Estudios realizados con M. phlei indican que el mayor componente de los pigmentos de este microorganismo son  $\beta$ -carotenos (40), así como los de los fotocromógenos contienen  $\beta$ -caroteno, licopeno, xantofila y  $\alpha$ -caroteno. Tsukamura (40) ha encontrado que el mayor componente de los que presentan los microorganismos del grupo II de Runyon también son  $\beta$ -carotenos; la fotosíntesis de estos requiere glicerol, glucosa o piruvato, por lo cual la formación de pigmentación en las micobacterias está influenciada por la composición del medio (40).

Se ha llegado a determinar que se pueden presentar variantes en cuanto a la pigmentación, ya que en especies que predominantemente la presentan pueden encontrarse variantes no cromógenas o visceversa. Esta característica no está relacionado con la virulencia, pero es probable que proteja a las micobacterias de la fotosensibilización y del efecto letal de

la luz ultravioleta.

#### b.4) Acido-resistencia

La retención de carbolfucsina, auramina O y otros colorantes después del tratamiento con alcohol-ácido es una característica del género Mycobacterium, pero no está limitada a él. Géneros relacionados, particularmente Nocardia y Corynebacterium, presentan también esta propiedad.

La explicación química a esta ácido-resistencia aún está obscura. Sin embargo, Goren en 1972 postuló que probablemente lo que sucede es que el colorante forma un complejo con los ácidos micólicos de la pared celular, aumentando el carácter hidrofóbico de las capas superficiales y quedando de esta manera el colorante atrapado en el interior de la célula. Al tratar con alcohol-ácido, todas las células micobacterianas resisten este tratamiento sin alterarse y quedan teñidas del color característico del colorante utilizado.

El grado de ácido-resistencia varía entre las especies y además depende de las condiciones de cultivo (12). Las micobacterias de rápido crecimiento muestran una disminución a la ácido-resistencia cuando crecen en un medio conteniendo 2% de glicina. M. leprae es débil a la ácido-resistencia y según estudios realizados se ha determinado que este microorganismo contiene glicina en lugar de alanina en el péptidoglicano de la pared celular, lo cual hace pensar que la alanina podría ser importante en el mecanismo de la tinción y por ende de la ácido-resistencia (12).

#### c) Requerimientos nutricionales:

Los miembros del género Mycobacterium varían enormemente en lo que respecta a su velocidad de crecimiento y requerimientos nutricionales. Así, M. smegmatis desarrolla en pocos días en un medio simple; M. ulcerans

requiere algunos meses de incubación para su desarrollo en un medio complejo, y M. leprae no desarrolla in vitro.

### c.1) Fuentes de carbono y nitrógeno

La mayoría de las micobacterias desarrollan en un medio simple, conteniendo una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y metales iónicos esenciales, incluyendo fierro y magnesio. Las fuentes de carbono incluyen carbohidratos como glucosa y glicerol y ácidos orgánicos, especialmente ácido pirúvico. Las fuentes de nitrógeno utilizadas por las diferentes especies son sales de amonio, ciertas amidas o aminoácidos, y en algunos casos, nitratos. La asparagina se utiliza generalmente en los medios de cultivo como fuente de nitrógeno.

Las micobacterias de rápido crecimiento muestran una gran actividad sacarolítica; en cambio, las micobacterias de lento crecimiento presentan una actividad sacarolítica muy limitada. Esta capacidad de utilización tiene importancia taxonómica y de diagnóstico. Los aminoácidos como glicina, alanina y asparagina se utilizan como fuente de nitrógeno, tanto que los aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptofano, no pueden ser empleados por las micobacterias.

El crecimiento de las micobacterias es estimulado por pequeñas cantidades de ácidos grasos pero, inhibido por grandes concentraciones (12).

### c.2) Asimilación de fierro

La deficiencia de algunos elementos tiene consecuencias observables sobre la estructura y metabolismo de las micobacterias. Especialmente notables son las causadas por una deficiencia de fierro tales como: elon gación de las células, declinación de la síntesis de ADN, decremento en la actividad de enzimas que requieren Fe, bajo contenido de citocromos

e incremento de isoflavonoides.

La naturaleza insoluble del fierro a pH fisiológico ha dado como resultado la evolución de los sistemas para su transporte hacia la célula. Debido a la gruesa pared celular rica en lípidos de las micobacterias, el sistema consiste en dos componentes que quelan el fierro: la exoquelina, que es un compuesto extracelular soluble en agua y, las micobactinas, que son moléculas liposolubles localizadas en la superficie de la célula bacteriana. En el modelo propuesto, el  $Fe^{3+}$  del medio extracelular es solubilizado por exoquelinas y luego, en contacto con la pared celular micobacteriana, es tomado por la micobactina y transportado a través de la pared. La micobactina, originalmente aislada de M. phlei y como un factor de crecimiento para M. paratuberculosis, está presente en todas las micobacterias.

#### d) Clasificación:

Durante el presente siglo han sido varias las clasificaciones propuestas para el género Mycobacterium.

##### d.1) Clasificación de Runyon

En un estudio realizado por Timpe y Runyon en 1954 (39), aislaron de pacientes un total de 100 cepas diferentes de M. tuberculosis y propusieron una agrupación para esos microorganismos. En 1959 Runyon introduce el término de "atípicas" o "anónimas" para denominar a las micobacterias diferentes de M. tuberculosis, distinguiendo cuatro grupos: Grupo I o fotocromógenos, Grupo II o escotocromógenos, Grupo III o no cromógenos, y Grupo IV o de crecimiento rápido (Tabla I).

En la actualidad el término "atípico" o "anónimo" utilizado por Runyon para clasificar a las micobacterias diferentes de M. tuberculosis,

TABLA I

CLASIFICACION DE RUNYON PARA EL GENERO  
MYCOBACTERIUM

GRUPO RUNYON	MORFOLOGIA COLONIAL Y CRECIMIENTO
Bacilo tuberculoso ( <u>M. tuberculosis</u> y <u>M. bovis</u> )	Colonias secas, color ante, crecimiento lento (4 semanas a 37°C).
I FOTOCROMOGENOS	Requieren dos semanas para su crecimiento a 37°C y de tres semanas a temperatura ambiente. Colonias pigmentadas después de exponer a la luz.
II ESCOTOCROMOGENOS	Crecen lentamente a 37°C. Generalmente presentan pigmentación amarilla o amarillo anaranjado si crecen en la obscuridad, y pueden intensificar el color del pigmento a anaranjado rojizo si son expuestas a la luz.
III NO CROMOGENAS	Crecimiento lento a 37°C, algunas cepas pueden crecer a 25°C. Son colonias húmedas, lisas y no pigmentadas.
IV DE RAPIDO CRECIMIENTO	Crecimiento rápido a 25°C (una semana), usualmente son colonias no pigmentadas.

no es aceptado, ya que no son atípicas del género y deben designarse como Mycobacteria no tuberculosas o Mycobacteria diferentes del bacilo tuberculoso.

La clasificación propuesta por Runyon ha sido de las más importantes y de mayor trascendencia, aunque fue establecida sobre criterios subjetivos e inconstantes y no responde a las exigencias de la Taxonomía Internacional.

#### d.2) Clasificaciones Adansonianas

Bojalil, Cerbón y Trujillo (1962) presentan una clasificación de las micobacterias de acuerdo con su capacidad de utilización de diferentes carbohidratos (40).

Tsukamura (40) en 1966 divide a las Mycobacteria en dos grupos: micobacterias de lento crecimiento y micobacterias de rápido crecimiento. Esos dos grupos pueden ser diferenciados, no solamente por su velocidad de crecimiento, sino por otras características como son: tolerancia al ácido pícrico 0.2%; utilización de succinato, malato y fumarato como fuentes de carbono en presencia de nitrógeno amoniacal; utilización de glutamato como fuente de nitrógeno y carbono; tolerancia a  $\text{NaNO}_2$  0.1% en agar Sauton; tolerancia al NaCl 5% ; formación de ácido a partir de manosa (Tabla II). Tsukamura (40) propone que estos dos grupos pueden clasificarse como subgéneros de Mycobacterium: subgénero Mycobacterium (lento crecimiento) y subgénero Mycomycobacterium (rápido crecimiento).

En 1977, García Sabater, Amador Yscla y Perales Abenich (9) proponen una división del género Mycobacterium tomando como base características bioquímicas y de cultivo. Subdividen al género en subgéneros: Monomycobacterium (micobacterias típicas), Bymycobacterium (micobacterias de desarrollo lento) y Polymycobacterium (micobacterias de desarrollo rápido).



TABLA II

DIFERENCIACION DE MYCOBACTERIA DE LENTO CRECIMIENTO Y RAPIDO CRECIMIENTO

Prueba	Resultado de la prueba	
	Lento crecimiento	Rápido crecimiento
Crecimiento en Agar Sauton conteniendo 0.2% de ácido pícrico	- <sup>1</sup>	+ <sup>2</sup>
Crecimiento en Agar Sauton conteniendo 0.1% de NaNO <sub>2</sub>	-	+
Crecimiento después de 3 días	-	+
Crecimiento en Lowenstein-Jensen conteniendo 5% de NaCl	-	+
Utilización de succinato, malato y fumarato como fuente de carbono en presencia de nitrógeno amoniacal.	-&	+

<sup>1</sup> Con excepción de M. simiae

<sup>2</sup> Con excepción de M. chelonae subespecie chelonae. M. flavescens está incluida en el grupo de las micobacterias de rápido crecimiento.

& M. flavescens está incluida en el grupo de las micobacterias de lento crecimiento.

Tomada de: Rev. Infec. dis., 3 (5): 843, 1981.

Todas las especies pertenecientes a cada uno de los subgéneros tienen una o varias características en común, las del subgénero Monomycobacterium no desarrollan en Agar Sauton y en el medio al Salicilato, no crecen a 28°C, y son potencialmente patógenas. Las del subgénero Bycomycobacterium desarrollan en agar Sauton y en el medio al Salicilato, crecen a 28°C y para su desarrollo requieren más de 7 días; y las del subgénero Polymycobacterium, crecen en Agar de Sauton y en el medio al Salicilato, lo hacen a una temperatura de 28°C y necesitan para su desarrollo menos de 7 días.

#### Clasificación:

##### Mycobacterium subgénero Monomycobacterium

M. tuberculosis

M. bovis

M. africanum

M. ulcerans

##### Mycobacterium subgénero Bymycobacterium

#### a) Especies fotocromógenas

M. kansasii

M. asiaticum

M. lycopinogeneas

#### b) Especies pigmentadas

M. avium

M. intracellulare

M. nonchromogenicum

M. terrae

M. novum

M. gastris

M. triviale

M. simiae

M. shimodei

Mycobacterium subgénero Polymycobacterium

a) Especies fotocromógenas

M. marinum

b) Especies pigmentadas

M. parafortuitum

M. aurum

M. vaccae

M. rhodesiae

M. obuense

M. phlei

M. thermoresistibile

M. flavescens

M. gilvum

M. duvalii

M. gadium

M. agri

M. neoaurum

M. chubuense

M. aichiense

M. tokaiense

M. valentiae

## c) Especies no pigmentadas

M. fortuitumM. chelonei subespecie cheloneiM. peregrinumM. chelonei subespecie abscessusM. dierhoferiM. thamnopheosM. fortuitum subespecie tehermophilumM. smegmatis

## d.3) Clasificación actual

El Comité en Bacteriología e Inmunología de la Unión Internacional de Lucha contra la Tuberculosis (10) propuso en 1979 una nueva clasificación de las especies del género Mycobacterium, la cual ha sido aceptada y publicada (Tabla III).

## e) Importancia clínica de la tuberculosis:

Dentro del género Mycobacterium se encuentran las especies responsables de una de las más terribles enfermedades que han azotado a la humanidad: la tuberculosis.

## e.1) Enfermedad

El hombre es altamente susceptible a la infección tuberculosa, pero muy resistente al desarrollo de la enfermedad clínica. La tuberculosis es una enfermedad crónica que puede ser causada principalmente por M. tuberculosis y M. bovis (12)

En el proceso de la enfermedad puede estar implícito cualquier sis-

TABLA III

ESPECIES DEL GENERO MYCOBACTERIUM ACEPTADAS POR EL COMITE EN BACTERIOLOGIA E INMUNOLOGIA DE LA UNION INTERNACIONAL DE LUCHA CONTRA LA TUBERCULOSIS,

Grupo	Patógeno estricto o potencial	Patógeno ocasional o no patógeno
Desarrollo lento o no cultivables y patógenos estrictos	<u>M. tuberculosis</u> <u>M. bovis</u> <u>M. africanum</u> <u>M. leprae</u>	
Fotocromógenos	<u>M. kansasii</u> <u>M. marinum</u> <u>M. simiae</u> <u>M. asiaticum</u>	
Escotocromógenos	<u>M. scrofulaceum</u> <u>M. szulgai</u> <u>M. xenopi</u>	<u>M. gordonae</u> <u>M. flavescens</u>
No Fotocromógenos	<u>M. avium</u> <u>M. intracellulare</u> <u>M. malmoense</u> <u>M. haemophilum</u>	<u>M. terrae</u> <u>M. triviale</u> <u>M. nonchromogenicum</u>
De desarrollo rápido	<u>M. fortuitum</u> <u>M. chelonae</u>	<u>M. vaccae</u> <u>M. smegmatis</u> <u>M. pheli</u> <u>M. parafortuitum</u> <u>M. neoaurum</u> <u>M. thermoresistibile</u> <u>M. chitae</u> <u>M. gadium</u> <u>M. gilvium</u> <u>M. duvalii</u> <u>M. aurum</u>
Patógenos de animales	<u>M. lepraemurium</u> <u>M. microti</u> <u>M. paratuberculosis</u> <u>M. farciogenes</u> <u>M. senegalence</u>	

Tomada de: Clin. Microb. Newsletter, 1 (20), 1979.

tema del organismo. En algunos casos las lesiones son localizadas en un solo órgano, mientras que en otros casos puede ocurrir una diseminación. En términos del órgano que esté afectado, la tuberculosis puede ser dividida en tuberculosis pulmonar y en tuberculosis extrapulmonar.

#### e.1.1) Tuberculosis de infección primaria

Los bacilos tuberculosos penetran al organismo por inhalación, ingestión o a través de la piel. Con la inhalación, la lesión primaria se desarrolla en los pulmones. Los bacilos tuberculosos encuentran poca resistencia a su llegada al organismo y se multiplican casi sin ninguna restricción. Esta multiplicación bacilar se acompaña de un proceso inflamatorio formado por neutrófilos y monocitos y es importante hacer notar que casi no hay síntomas ni daños considerables. Después de esta etapa, los bacilos pueden llegar por vía linfática hasta los ganglios regionales y pasar al torrente sanguíneo. Durante este tiempo los antígenos del bacilo se pueden poner en contacto con el sistema inmune y desarrollar la respuesta inmune celular e hipersensibilidad tardía. A medida que se forman tubérculos, -como resultado de la interacción entre el bacilo tuberculoso y la respuesta inmune celular- el crecimiento de los bacilos se torna más lento, debido a que los macrófagos han sido activados por las linfocinas de los linfocitos T y empiezan a tener la capacidad de destruir a los bacilos. Esto da como resultado que el bacilo ya no se siga multiplicando y que en un tiempo relativamente corto se resuelva el proceso pulmonar así como otros focos extrapulmonares. El foco inicial pulmonar puede calcificarse y dar la imagen característica de la primoinfección tuberculosa. En este foco calcificado pueden sobrevivir los bacilos por años

o por toda la vida del sujeto. Los pacientes después de esta infección primaria desarrollan simultáneamente la capacidad de tener una prueba de Mantoux positiva. Cabe hacer notar que la infección primaria suele escapar a la observación clínica, y las lesiones generalmente curan, pero en algunos casos la lesión puede progresar (sobre todo en lactantes y en personas con deficiencias inmunológicas) permitiendo la diseminación de los bacilos tuberculosos por vía sanguínea, dando origen a la tuberculosis miliar o que pueden pasar al sistema nervioso, ocasionando meningitis tuberculosa o cualquiera de las otras formas de tuberculosis extrapulmonar.

Los niños entre tres y doce años rara vez padecen enfermedad progresiva, debido a que en este período de la vida la resistencia es más alta. Por otro lado, la susceptibilidad aumenta durante la adolescencia (8,15, 23).

#### e.1.2) Tuberculosis secundaria

La tuberculosis secundaria o post-primaria se puede presentar como una reactivación de un foco caseoso resultado de una infección primaria en el sistema linfático, o por reinfección con bacilos exógenos. Es probable que ocurran tanto la forma endógena como exógena de tuberculosis, pero la incidencia de cada una de ellas está determinada por la frecuencia de casos infecciosos en la comunidad. Estos tópicos fueron discutidos en la 22ava. Conferencia de la Unión Internacional contra la Tuberculosis (12) y la opinión general es que la reinfección exógena ocurre muy raramente. Se presentaron evidencias de que los focos se desarrollan en las partes superiores del pulmón como resultado de la diseminación primaria en el torrente circulatorio. Estos pueden progresar originando la enfermedad (tuberculosis de reactivación) o permanecer latentes durante 10,20 o más años antes de hacerse activos.

Existen pruebas en el sentido de que la reactivación en el adulto se produce a menudo por razones fisiológicas como: desnutrición, hacinamiento y situaciones de alarma y tensión (8,15,23).

e.2) Especies del género Mycobacterium implícitas en la tuberculosis pulmonar:

El descubrimiento del agente causal de la tuberculosis fue hecho por Koch en 1882 y a finales del mismo siglo fueron descritas varias especies del género Mycobacterium, diferentes del bacilo tuberculoso. A principios del siglo XX se reportaron algunos casos producidos por micobacterias no tuberculosas aisladas a partir de muestras clínicas. Sin embargo, las únicas micobacterias consideradas como patógenas para el hombre eran M. tuberculosis y M. bovis ya que el diagnóstico de laboratorio se basaba únicamente en la búsqueda de bacilos ácido-alcohol resistentes en las muestras clínicas.

Fue hasta mediados de este siglo, cuando se comenzó a dar importancia a las micobacterias no tuberculosas como causantes de enfermedad en el hombre, debido a que se comenzaron a efectuar cultivos para su aislamiento, así como la realización de pruebas bioquímicas, en la mayoría de los laboratorios.

La enfermedad pulmonar crónica semejante a la tuberculosis representa el más importante problema clínico asociado con las micobacterias no tuberculosas, siendo M. kansasii y M. avium-intracellulare los patógenos más comúnmente aislados.

Datos proporcionados por el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos de América (1979-1980) (11) revelan que de todos los aislamientos de Mycobacteria con significancia clínica, el más frecuente es



M. tuberculosis, seguido del complejo M. avium-intracellulare, el complejo M. fortuitum, M. kansasii y M. scrofulaceum. Se reportó además un caso de tuberculosis pulmonar por M. thermoresistibile (46) y se observó que algunas especies se aíslan más frecuentemente en una zona geográfica particular; así M. kansasii lo es con mayor frecuencia en Florida, California y Texas.

De acuerdo con un estudio realizado en Japón (42), la incidencia de enfermedad pulmonar causada por micobacterias no tuberculosas ha aumentado en los últimos años (1971-1979). M. kansasii, M. avium-intracellulare y M. fortuitum, son los microorganismos más frecuentemente aislados. Igualmente se encontró una gran relación entre la especie aislada y una zona geográfica particular.

En Gales, Inglaterra, la incidencia de tuberculosis ha declinado en los últimos años, pero de los casos que se presentan, aproximadamente el 2.9% corresponde a tuberculosis causada por micobacterias no tuberculosas; el microorganismo más frecuentemente aislado es M. kansasii. Se han reportado pocos casos de enfermedad pulmonar por el complejo M. avium-intracellulare-scrofulaceum (MAIS) pero son más difíciles de tratar; también es raro encontrar M. xenopi y M. malmoense (14).

Durante un año de estudio para ver la frecuencia de aislamiento de micobacterias no tuberculosas en algunas provincias de Holanda, se detectaron 9 casos de enfermedad pulmonar por M. kansasii (7). La tipificación por fagos indicó que existe un tipo especial de M. kansasii que predomina en cada ciudad.

En Sudáfrica, la tuberculosis (16) es un gran problema de salud pública; durante 1972-1975 hubo una gran prevalencia de infección micobacte

riana debida a micobacterias no tuberculosas; el agente potencialmente patógeno que se encontró fue el complejo M. avium-intracellulare.

Se ha observado que la enfermedad pulmonar debida a M. kansasii o M. avium-intracellulare se presenta principalmente en hombres de raza blanca de aproximadamente 40-48 años de edad, con antecedentes de enfermedad pulmonar crónica (36,48), aunque se puede presentar en personas de cualquier edad, sin enfermedad pulmonar aparente o deficiencias inmunológicas. Algunas causas predisponentes pueden ser: diabetes mellitus, enfermedad renal, tuberculosis previa, y bronquitis crónica. En Tailandia, de 24 pacientes con enfermedad pulmonar causada por micobacterias no tuberculosas, 16 presentaban antecedentes de tuberculosis pulmonar (36).

La exposición al polvo puede ser una causa predisponente para sufrir una infección por M. kansasii, como se demostró en estudios realizados en Escocia y Sudáfrica (48) en mineros.

La teoría más aceptada para la transmisión de enfermedad pulmonar asociada con micobacterias no tuberculosas, es que se adquiere por contacto con alguna fuente del medio ambiente. Bailey en 1972 (37) demostró la presencia de cepas potencialmente patógenas de M. kansasii en el agua. En los Estados Unidos de América, las enfermedades causadas por M. kansasii se observan con mayor frecuencia en California y Texas (11). Debido a esto se realizó un análisis del agua utilizada para consumo en una población de Texas (37) y se encontró una gran incidencia de M. kansasii potencialmente patógena (con producción elevada de catalasa), lo cual hace pensar que el agua podría ser una fuente de contaminación y un enlace importante en el cuadro epidemiológico de la enfermedad (11,29).

Se han reportado casos de meningitis causada por M. kansasii y M. avium intracellulare en pacientes inmunodeprimidos (48).

### e.3) Tratamiento

En la quimioterapia antituberculosa se consideran dos fases importantes.

La fase I consiste en la quimioterapia inicial en forma intensiva, con el objeto de destruir de manera rápida las grandes poblaciones de bacilos tuberculosos que se encuentran en multiplicación; por esta razón, cuando están en número considerable, es necesario administrar dos o tres drogas simultáneamente para tener la seguridad de eliminar todos los microorganismos con actividad metabólica y evitar el peligro de un crecimiento excesivo del número de las bacterias resistentes, ya que la resistencia bacteriana a drogas antituberculosas se presenta por mutación natural, sobre todo si se está usando un solo fármaco.

La fase II consiste en la quimioterapia de sostén, que está dirigida a eliminar la mayor parte de los bacilos que aún quedan; de hecho, son bacilos "inactivos" que en un momento dado pueden regresar a una etapa de crecimiento activo. Esta etapa del tratamiento depende del efecto que puedan tener las drogas sobre los microorganismos "inactivos" durante sus breves períodos de actividad metabólica, ya que los microorganismos que no estén en fase metabólica no son afectados por la quimioterapia. Este fenómeno explica la necesidad de seguir el tratamiento por largo tiempo. Durante este período prolongado de terapéutica, los bacilos "inactivados" pueden reactivarse de cuando en cuando y la presencia constante de drogas los elimina durante los breves lapsos de actividad. Los bacilos que persisten una vez que se ha concluido el tratamiento, son controlados por el sistema inmunológico de la persona afectada; sin embargo, siguen siendo un riesgo en pacientes que presenten alteraciones en períodos posterior

res.

Dentro de los fármacos más utilizados para el tratamiento de la tuberculosis se encuentran: la rifampicina, piracinamida, isoniacida, estreptomycin, etambutol y tiacetazona (6,13)(Tabla IV).

Se incluyen en los esquemas de tratamiento de la tuberculosis los convencionales o habituales (Tabla V).

Se han elaborado esquemas cortos de tratamiento, cuya duración fluctúa entre 4 y 12 meses. Los mejores resultados obtenidos hasta la fecha los ha dado el esquema empleado por la Asociación Británica Torácica y de Tuberculosis (Tabla VI).

Las ventajas que se reportan a estos tratamientos acortados son:

- 1) disminuyen la incidencia de abandonos, 2) aceleran la negativización bacteriológica, 3) disminuyen la probabilidad de recaída bacteriológica, 4) disminuyen las mutantes resistentes de la población bacilar, 5) disminuyen la intolerancia a las drogas, 6) mejoran la cooperación del enfermo en vista de que es menor el tiempo que debe estar sujeto a tratamiento y 7) disminuyen los costos de operación. Todas estas ventajas seguramente reducirán el problema de la tuberculosis (13,26,27).

El tratamiento de corta duración se implantó en cinco estados de la República Mexicana y el Distrito Federal el 10. de Junio de 1979, y de acuerdo con los resultados obtenidos se observó su eficacia, ya que de un grupo constituido de 131 enfermos de tuberculosis pulmonar en los cuales se aplicó este tratamiento, 104 (79.4%) curaron, 5(3.8%) fallecieron y de 2(1.5%) se desconoce el resultado. Estos esquemas de tratamiento anti-tuberculoso de corta duración comprendieron una primera fase de dos meses de duración, con administración diaria supervisada y una segunda de

TABLA IV

## ACCION DE LOS FARMACOS EN LA ACTIVIDAD DEL BACILO TUBERCULOSO

Actividad metabólica del bacilo  
tuberculoso:

Fármaco	Multiplicación activa (usualmente extrace- lular)	Multiplicación lenta	
		a pH ácido (intracelular)	a pH neutro (extracelular)
Estreptomina	+++	0	0
Isoniacida	++	+	+
Rifampicina	++	+	+
Piracinamida	0	++	0
Etambutol	+	+	0

La acción de los fármacos está expresada en una escala de 0 a +++ como sigue:

0 = no hay acción

+ = acción bacteriostática

+, ++, +++ = acción bactericida en orden creciente

Tomada de: J. Infect. dis., 146 (5): 700, 1982.

TABLA V

## TRATAMIENTO DE TUBERCULOSIS PULMONAR Y EXTRAPULMONAR ACTIVA

Medicamento	Dosis	REGIMEN HABITUAL
		Toxicidad
PRIMARIOS		
Isoniacida (INH)	5 a 10 mg/kg/día (máximo 300 mg) una sola dosis al día oral.	1) hepática 2) neurológica (1 y 2 raras en niños) 3) hipersensibilidad (fiebre, rash)
Rifampicina	10 a 20 mg/kg/día (máximo 600 mg) por vía oral	Hepática, hematológica (agranulocitopenia, trombocitopenia) Hipersensibilidad (síndrome semejante a gripe, choque)
Etambutol	15 mg/kg/día por vía oral en una dosis al día	Neuritis retrobulbar

Tratamiento mínimo 18 meses

Debido al alto costo de la rifampicina, se aconseja que este fármaco se administre sólo el tiempo necesario para lograr la negativización del esputo.

Tomada de: *Infectología*, 1 (1): 79, 1981.

## TABLA VI

ESQUEMA CORTO DE TRATAMIENTO PARA TUBERCULOSIS PULMONAR SEGUN LA ASOCIACION BRITANICA TORACICA Y DE TUBERCULOSIS

---

Inh + Rif + Sm o Emb diario 2 meses

continuado con

Inh + Rif durante 4-10 meses diariamente

---

Inh = isoniacida (300 mg)

Sm = estreptomicina (20-40 mg/kg)

Rif = rifampicina (600 mg)

Emb = etambutol (10-15 mg/kg)

Tomada de: *Infectologia*, 1 (1): 80, 1981.

4 meses, autoadministrada para el esquema I, y supervisada para los esquemas II y III (Tabla VII). De acuerdo con la cifra de abandono (10,7%) observada, en comparación con la que se tenía a nivel nacional (32%) con un año de tratamiento, el de 6 meses de duración es eficaz (27).

La mayoría de las micobacterias no tuberculosas son resistentes a la isoniacida y estreptomina. Las enfermedades por M. kansasii, M. intracellulare y M. marinum se tratan con etambutol-rifampicina en forma efectiva. Sin embargo, M. scrofulaceum, M. fortuitum y M. chelonae son resistentes a la mayoría de los agentes antituberculosos, incluyendo etambutol-rifampicina. Estudios recientes muestran la efectividad de amikacina-eritromicina-tetraciclina y sulfonamidas frente a las enfermedades causadas por estas micobacterias. Se ha visto el efecto inhibitorio in vitro que presenta el sulfametoxazol sobre M. kansasii, M. scrofulaceum y M. fortuitum (18,43,44,45,47,49).

Para obtener mejores resultados en el tratamiento de las enfermedades por M. kansasii, se ha recomendado el uso de una combinación triple de drogas, incluyendo rifampicina, uno de los aminoglucósidos (estreptomina, kanamicina y viomicina) y etionamida o etambutol. Para enfermedades por M. avium-intracellulare se recomienda la combinación de rifampicina -kanamicina-etionamida o rifampicina-kanamicina-etambutol (1,18, 28).

#### e.4) Epidemiología y control de la tuberculosis en México:

La tuberculosis en nuestro país continúa como una enfermedad endémica y constituye un grave problema de salud pública(26). En 1975 ocupó el décimo primer lugar entre las causas de defunción (Tabla VIII) y el dé



TABLA VII

## ESQUEMAS DE TRATAMIENTO ANTITUBERCULOSO DE CORTA DURACION

Esquema:

I	2 meses supervisado (6 días)	
	Sm ( 1gr) Hain (300 mg) Rif (600 mg) Pir ( 2 gr)	1 Toma
	4 meses autoadministrado	
	Rif (600 mg) Hain (300 mg)	1 Toma
II	2 meses supervisado (6 días)	
	Sm (1 gr) Hain (300 mg) Rif (600 mg) Pir ( 2gr)	1 Toma
	4 meses supervisado	
	Rif (600 mg) Hain (600 mg)	1 Toma
III	2 meses supervisado (6 días)	
	Sm ( 1gr) Hain (300 mg) Rif (600 mg)	1 Toma
	4 meses supervisado	
	Rif (600 mg) Hain (600 mg)	1 Toma

---

Tomada de: Informe de Labores, Dirección General de Control de la Tuberculosis y de las Enfermedades del Aparato Respiratorio

TABLA VII

## PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD EN LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

1975

CAUSAS	MORTALIDAD No.	%	TASA "
1. Influenza,neumonías y otras infecciones respiratorias agudas	59,037	13.5	98.2
2. Accidentes,envenenamientos y violencia	54,204	12.4	90.1
3. Enteritis y otras enfermeda- des diarreicas	51,061	11.7	84.9
4. Enfermedades del corazón	45,261	10.4	75.3
5. Enfermedades perinatales	21,765	5.0	36.2
6. Tumores malignos	21,674	5.0	36.0
7. Enfermedades cerebrovasculares	12,827	2.9	21.3
8. Cirrosis hepática	12,236	2.8	20.3
9. Diabetes mellitus	10,408	2.4	17.3
10. Bronquitis, enfisema y asma	10,257	2.4	17.0
11. Tuberculosis todas formas	8,516	2.0	14.1
12. Avitaminosis y otras deficien- cias nutricionales			
.... Todas las demás .....	121,581	27.9	20.2
<b>TOTAL</b>	<b>435,888</b>	<b>100.0</b>	<b>725.0</b>

" Por 100,000 habitantes

Fuente: Estadísticas vitales de los Estados Unidos Mexicanos,  
Dirección General de Bioestadística, S.S.A.

Tomada de: Sal.Púb.Méx., 22 (3): 252, 1980.

cimo sexto lugar entre las causas de morbilidad (Tabla IX) ,

El análisis de la morbilidad por tuberculosis durante el período 73-76, demuestra que no existe una disminución significativa en la notificación de casos nuevos, tanto en la forma pulmonar como en las variedades de tuberculosis extrapulmonar (Tabla X).

Las condiciones socioeconómicas juegan un papel importante en la transmisión de la enfermedad; así, se observa que predomina en las clases sociales más desamparadas y cuyas condiciones higiénicas son más deplorables, ya sean obreros o campesinos.

De acuerdo con los estudios realizados se ha visto que la enfermedad predomina en sujetos mayores de quince años y tiene una gran trascendencia económica-social, pues ataca al sujeto en la época más productiva de la vida. Al ser la tuberculosis una enfermedad crónica y su tratamiento prolongado, un gran porcentaje de enfermos abandona el tratamiento y, como consecuencia, se vuelven a presentar los síntomas característicos de este padecimiento.

Los datos obtenidos durante 1978 por el Grupo Coordinador Interinstitucional de Tuberculosis y Enfermedades del Aparato Respiratorio confirman la magnitud del problema de salud pública que implica la enfermedad tuberculosa (Tabla XI).

En la actualidad , a pesar de que contamos con los procedimientos necesarios para su control, no se posee una estructura en el sector salud suficientemente eficaz para que las acciones se cumplan. Mientras no existan servicios de salud debidamente organizados, capaces de incorporar al tratamiento a todo caso diagnosticado y evitar al máximo las deserciones durante su aplicación, el problema de la tuberculosis conti-

TABLA IX

## PRINCIPALES CAUSAS DE MORBILIDAD EN LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

CAUSAS	1976	
	Número de casos	tasa "
1. Entiritis y otras enfermedades diarreicas	457,046	733.27
2. Influenza	185,459	297.58
3. Infecciones respiratorias agudas	147,063	235.94
4. Amibiasis	100,306	160.92
5. Sarna	74,880	120.13
6. Parasitosis no especificada	72,468	116.26
7. Otras helmintiasis intestinales	64,467	103.42
8. Micosis	34,139	54.77
9. Sarampión	23,722	38.05
10. Paludismo	18,568	29.79
11. Blenorragia	17,057	27.36
12. Otras enfermedades intestinales debidas a protozoarios	15,690	25.17
13. Neumonías	14,438	23.16
14. Parotiditis	14,057	22.55
15. Salmonelosis	11,952	19.17
16. Tuberculosis pulmonar	10,961	17.58

" Por 100,000 habitantes

Fuente: Dirección General de Bioestadística, S.S.A.

Tomada de: Sal.Púb.Méx., 22 (3); 252, 1980.

TABLA X

MORBILIDAD POR TUBERCULOSIS EN LOS ULTIMOS CUATRO AÑOS EN LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS.

1973 - 1976

AÑO	TUBERCULOSIS PULMONAR	TUBERCULOSIS OTRAS FORMAS	TOTAL
1973	13,577	371	13,948
1974	11,345	264	11,609
1975	10,964	453	11,417
1976	10,961	371	11,332

Fuente: Dirección General de Bioestadística, S.S.A.

Tomada de: Sal.Púb.Méx., 22 (3): 253,1980.

TABLA XI

## GRUPO COORDINADOR INTERINSTITUCIONAL. INCIDENCIA Y PREVALENCIA DE ENFERMOS TUBERCULOSOS PULMONARES.

Institución	Enfermos descubiertos en 1978	Existentes al 31 dic. 1978
SSA	10,802 "	19,792 "
IMSS	11,249	27,000
ISSSTE	1,531	2,275
DDF	160	396
SDN	327	455
SM	81 "	177 "
PEMEX	70	213
FNM	144	255
DIF	18	126

## " Confirmación bacteriológica

INSTITUCIONES: Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los trabajadores del Estado (ISSSTE), Departamento del Distrito Federal (DD), Secretaría de la Defensa Nacional (SDN), Secretaría de Marina (SM), Petróleos Mexicanos (PEMEX), Ferrocarriles Nacionales de México (FNM), Sistema Nacional para el Desarrollo Integral de la Familia (DIF).

Tomada de: Sal.Púb.Mé., 22 (3): 254, 1980.

nuará.

Para tratar de manejar el problema se ha elaborado un Programa Nacional de Control de la Tuberculosis (26,32), cuyos lineamientos son:

- a) Vacunación con BCG
- b) Incremento de la búsqueda por microscopía
- c) Estudio de los contactos
- d) Tratamiento ambulatorio
- e) Investigación de la tuberculosis bovina
- f) Educación para la salud
- g) Coordinación de las Instituciones de salud
- h) Cursos al personal médico y de laboratorio

f) Diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis :

En el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis deben seguirse tres pasos fundamentalmente:

- a) Demostración de bacilos ácido-alcohol resistentes en las muestras clínicas.
- b) Aislamiento del agente causal en forma pura
- c) Identificación del microorganismo mediante pruebas bioquímicas.

f.1) Recolección de muestras

Las micobacterias pueden aislarse a partir de una variedad de muestras clínicas, incluyendo esputo, orina y líquido cefalorraquídeo, de biopsias de hígado, médula ósea y nódulos linfáticos, o bien de cualquier fuente que se sospeche como sitio de enfermedad tuberculosa. Las muestras que contienen una flora bacteriana mixta se deben procesar rápidamente para reducir el problema de contaminación de los cultivos. El esputo debe recogerse por la mañana y aunque se ha sugerido que en una muestra de 24

horas puede haber mayor recuperación de las micobacterias, la incidencia de contaminación es también mayor. Se deben recoger un mínimo de 3 muestras en pacientes en quienes se sospeche una tuberculosis pulmonar o renal. Los productos se deben transportar rápidamente al laboratorio, y refrigerar si no se procesan inmediatamente (15,35).

#### f.2) Descontaminación y concentración de las muestras

El alto contenido de lípidos en la pared celular de las micobacterias las hace resistentes a la acción de las soluciones ácidas y alcalinas fuertes, lo que no sucede con otras bacterias. Debido a esto, las muestras clínicas que pueden contener una flora bacteriana mixta se tratan con un agente descontaminante (ácido o álcali) para eliminar organismos diferentes de las micobacterias, licuar la mucina y poder concentrar por centrifugación a las micobacterias. Uno de los agentes descontaminantes más utilizado en los laboratorios es el NaOH al 4%, el cual tiene acción mucolítica que favorece la concentración de las bacterias a las que se aplica la centrifugación. El tiempo de exposición de la muestra con el agente descontaminante, debe controlarse para evitar un daño químico excesivo.

El ácido oxálico al 5% se utiliza sobre todo en aquellos casos en los cuales las muestras contienen Ps. aeruginosa como contaminante, pero al igual que el NaOH al 4% se debe controlar el tiempo de exposición.

El método del fosfato trisódico-cloruro de benzalconio (Zefirán) se emplea en muchos laboratorios, ya que no es necesario controlar el tiempo de exposición con la muestra.

El cloruro de benzalconio sirve como descontaminante y el fosfato trisódico como agente homogenizante. Las muestras tratadas por este método



se deben inocular en un medio a base de huevo para neutralizar la inhibición del desarrollo provocado por el cloruro de benzalconio. Si se utilizan medios a base de agar conviene usar lecitina para neutralizar la acción de aquel descontaminante (15,35).

Se ha descrito el empleo de una solución concentradora que contiene NaOH al 2% y n-acetil-l-cisteína (NALC). El NALC es un agente mucolítico que actúa reduciendo los enlaces disulfuro y liberando a las Mycobacteria. El NaOH al 2% en la solución sirve como descontaminante, usualmente se emplea HCL para neutralizar a este agente descontaminante; debido a la potencia de estas soluciones es difícil lograr un punto final neutro. La ventaja del NALC es que, al utilizar un gran volumen de amortiguador de fosfatos, disminuye la posibilidad de cambios de pH. El amortiguador sirve para lavar la muestra, diluir las sustancias tóxicas y disminuir la densidad de las muestras, haciendo que la centrifugación sea más efectiva.

El cloruro de cetilpiridinio al 1% con NaCl al 2%, es un agente descontaminante muy efectivo; se utiliza en aquellos casos en los cuales las muestras de esputo deben ser transportadas. El bacilo tuberculoso sobrevive hasta 8 días sin pérdida significativa de su viabilidad (20).

### f.3) Tinción y examen microscópico de bacilos ácido-alcohol-resistentes.

La presencia de bacilos ácido alcohol-resistentes en muestras clínicas, constituye una valiosa ayuda para la detección precoz de la enfermedad y el control de la terapia antimicrobiana.

Generalmente se utilizan dos tipos de tinciones para la búsqueda de bacilos ácido-alcohol resistentes.

#### 1. Tinciones con carbolfucsina

a) Ziehl-Neelsen ("tinción caliente")

b) Kinyoun ("tinción fría")

2. Tinciones fluorocrómicas: auramina O, con rodamina o sin ella, que es un segundo fluorocromo.

El frotis teñido con carbolfucsina debe observarse con un objetivo de inmersión en aceite, que limita de esta manera el área total del frotis que se puede visualizar en una unidad de tiempo. En cambio, los frotis teñidos con auramina O, es posible observarlos con un objetivo 25X, que aumenta el campo visual y reduce el tiempo requerido para explorar un área determinada del frotis. Las bacterias teñidas con auramina O se observan de color amarillo brillante en un fondo oscuro, lo que permite visualizar los frotis con menor aumento, sin pérdida de sensibilidad. Debido a que con las tinciones fluorocrómicas se observa un área del frotis significativamente más extensa por unidad de tiempo que con la tinción con carbolfucsina, ofrecen la ventaja de una mayor sensibilidad.

Al realizar el reporte de la observación microscópica se debe saber el número relativo de bacilos ácido-alcohol resistentes presentes. El Comité de Revisión para el Diagnóstico Estándar de la Sociedad Americana Torácica, ha recomendado un esquema relacionado con la Escala de Gaffky para realizar dicho reporte (35) (Tabla XII).

Si se observan sólo uno o dos bacilos, se debe reportar el número y repetir el estudio, ya que pueden estar presentes artefactos y dar resultados falsos positivos.

#### f.4) Medios de cultivo

Dentro de los medios utilizados para el aislamiento y crecimiento de las micobacterias tenemos:

##### Medios de cultivo no selectivos

Se utilizan medios de cultivo a base de huevo; el más comúnmente

TABLA XII

NUMERO RELATIVO DE BACILOS ACIDO-ALCOHOL RESISTENTES PRESENTES EN UN FROTIS, PROPUESTO POR EL COMITE DE REVISION EN DIAGNOSTICO ESTANDAR DE LA SOCIEDAD AMERICANA TORACICA.

Escala de Gaffky	No. de bacilos ácido alcohol resistentes observados	Reporte
0	No se observó ningún bacilo en todo el frotis	Negativo (0)
1	Se observaron de 3 a 9 bacilos en todo el frotis	Escasos (+)
3	Se observaron 10 o más bacilos en todo el frotis	Pocos (++)
6	Se observaron 10 o más bacilos por campo	Numerosos (+++)

Tomada de: The Clinically significant Mycobacteria: Recognition and identification; American Society of Clinical Pathologists, pág. 65

empleado es el de Lowenstein-Jensen, que además contiene glicerol, harina de papa y verde de malaquita al 0,025%, como inhibidor. El medio de Petragnani es elaborado con una base de leche y verde malaquita al 0,052% y es más inhibitorio que el de Lowenstein-Jensen. Se utiliza en aquellos casos en que las muestras están muy contaminadas.

Durante 1950, Cohen y Middlebrook desarrollaron una serie de medios de cultivo para el aislamiento de Mycobacteria. Están constituidos a base de ácido oleico, vitaminas y glicerol, cofactores, sales definidas y albúmina. La detección de desarrollo en estos medios es a los 10-12 días en lugar de los 18-24 días de incubación requeridos para otros. El 7H9 de Middlebrook es un medio líquido y el 7H10 y 7H11 de Middlebrook son sólidos y se utilizan para el aislamiento y pruebas de susceptibilidad.

El medio 7H11 difiere del 7H10 porque contiene hidrolizado de caseína al 1%; se ha comprobado que este aditivo mejora la velocidad y cantidad de desarrollo de las micobacterias resistentes a la isoniacida (15).

#### Medios de cultivo selectivos

Uno de los medios de cultivo selectivos más utilizado es el descrito por Gruft, que está formado por el medio de Lowenstein-Jensen adicionado de penicilina, ácido nalidixico y ARN. Existe también este mismo medio de Lowenstein-Jensen, pero conteniendo ciclohexamida, lincomicina y ácido nalidixico. Es muy útil ya que evita la contaminación fúngica y bacteriana. El 7H11 selectivo contiene carbenicilina, polimixina, lactato de trimetropim y anfotericina B; se ha demostrado que con él hay una recuperación mayor de las micobacterias, sobre todo cuando se utiliza como agente descontaminante NALC-NaOH al 2%.

#### f.5) Incubación de los cultivos

Todos los cultivos deben incubarse a 35<sup>o</sup>-37<sup>o</sup>C. Los cultivos de lesiones de piel deben incubarse a 30-32<sup>o</sup>C. Las micobacterias se desarrollan mejor en una atmósfera con 3 a 11% de CO<sub>2</sub>. El uso de CO<sub>2</sub> es necesario cuando se utiliza el medio 7H10 o 7H11 de Middlebrook,

La mayoría de las micobacterias patógenas para el hombre desarrollan en un periodo de 2 a 4 semanas de incubación. Cuando se sospecha de tuberculosis, el resultado no se debe reportar negativo hasta las 8-10 semanas de incubación.

#### f.6) Identificación de las Mycobacteria

Son muy numerosas las pruebas propuestas (15,17,20,35,40) para la identificación de las micobacterias. En la lista siguiente se muestran algunas de las más conocidas.

Actividad de fosfatasas ácidas

Actividad de  $\beta$ -galactosidasa

Degradación de ácido p-amino salicílico y salicílico

Cromatografía de lípidos en capa fina

Actividad de peptidasa

Reducción de ácido p-aminobenzoico

Reducción de ácido p-nitrobenzoico

Reducción de ácido pícrico

Degradación del ácido p-nitrofenol acético

Acumulación de niacina

Actividad de la nitrato reductasa

Actividad de catalasa

Actividad de la arilsulfatasa

Hidrólisis de Tween-80

Reducción de telurito

Crecimiento en Agar MacConkey

Actividad de ureasa

Producción de pigmento

Las últimas 9 pruebas son las utilizadas más comúnmente en el laboratorio, para la identificación y diferenciación de las Mycobacteria (17,35)

Se han descrito una serie de pruebas para la diferenciación del bacilo tuberculoso (M. tuberculosis y M. bovis) de otras micobacterias (Tabla XIII) (40).

**Acumulación de niacina:** La niacina la forman todas las micobacterias como subproducto metabólico, pero la mayoría de las especies poseen una enzima que transforma la niacina libre en niacina ribonucleótido. M. tuberculosis, M. simiae, algunas cepas de M. marinum y M. bovis, carecen de esta enzima y acumulan niacina como subproducto hidrosoluble en el medio de cultivo.

**Fundamento:** En la prueba química para la detección de niacina, descrita por Runyon, el ácido nicotínico reacciona con el bromuro de cianógeno en presencia de una amina primaria, formando un compuesto amarillo (15,17, 20,35).

**Actividad de nitrato reductasa:** La presencia de la enzima nitrato reductasa es una importante característica de identificación. Las especies de M. tuberculosis, M. kansasii, M. szulgai y M. fortuitum reducen nitratos

TABLA XIII

COMBINACION DE PRUEBAS USADAS PARA LA DIFERENCIACION DEL BACILO TUBERCULOSO (M. tuberculosis y M. bovis) DE OTRAS MICOBACTERIAS

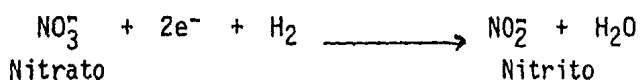
Combinación	Prueba	Resultado de las pruebas	
		Bacilo tubercu- loso	Otras mico- bacterias
1	Crecimiento en un medio con ácido p-nitrobenzoico (0.5 mg/ml)	-	+
	Crecimiento en un medio con teniendo hidroxilamina (62.5 mg/ml)	-	+
2	Producción de niacina (3 y 6 semanas)	±	-
	Crecimiento en un medio con- teniendo hidroxilamina	-	+
	Crecimiento en un medio con- teniendo la hidrazida del á- cido tiofeno-2-carboxílico	±	+
3	Crecimiento en un medio con- teniendo ácido p-nitrobenzoi- co (0.5 mg/ml)	-	+
	Crecimiento en medio de Ogawa conteniendo ácido salicílico (0.5 mg/ml)	-	+
	Crecimiento en un medio con- teniendo hidroxilamina (100 mg/ml)	-	+
	Crecimiento en agar Sauton	-	+
	Crecimiento a 28°C	-	+

+ resultado positivo, - resultado negativo, y ± resultado positivo para M. tuberculosis pero negativo para M. bovis.

Tomada de: Rev.Infect.dis. 3(5) : 842,1981.

a nitritos, al igual que M. flavescens, M. terrae, M. triviale y M. chelonj.

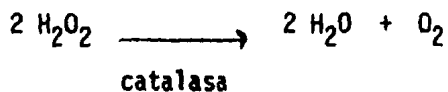
Fundamento: Las micobacterias que contienen nitrato-reductasa, pueden obtener oxígeno de nitratos y otros productos de reducción. La reacción química es:



La presencia de nitrito en el medio se detecta añadiendo sulfanilamida y n-naftiletildiamina en un pH ácido. Si hay nitritos se forma un colorante rojo de diazonio (17,20,35).

Prueba de la catalasa: La mayoría de las micobacterias producen la enzima catalasa, pero en cantidades variables; algunas enzimas pueden inactivarse por calentamiento a 68°C durante 20 minutos, mientras que otras son estables. La semicuantificación de catalasa y la susceptibilidad al calentamiento a 68°C y pH 7, son características útiles para la identificación de las micobacterias.

Fundamento: Los microorganismos que producen la enzima catalasa, tienen la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre (17,20,35).



Esta prueba se realiza con peróxido de hidrógeno al 30% en una solución detergente (tween-80). El detergente ayuda a que las micobacterias, hidrofóbicas, estrechamente agrupadas formando grandes agregados, se dispersen facilitando la detección de la catalasa.



Actividad de la arilsulfatasa: La arilsulfatasa es una enzima secretada por ciertas micobacterias. Los miembros del complejo M. fortuitum-chelonei son únicos entre las micobacterias que producen suficiente arilsulfatasa como para mostrar una prueba positiva a los tres días. Otras especies producen pequeñas cantidades de esta enzima, pero su crecimiento es tan lento que no se pueden dar resultados confiables. De esta manera, esta prueba se utiliza principalmente para la identificación de los microorganismos del complejo M. fortuitum-chelonei.

Fundamento: La arilsulfatasa es una enzima que libera fenoltaleína por desdoblamiento de la sal tripotásica del disulfato de fenoltaleína que se incorpora al agar ácido oleico; la prueba se realiza añadiendo una pequeña cantidad de una solución alcalina de carbonato de sodio a la superficie de un cultivo de 3 días. La aparición de un color púrpura indica una prueba positiva (17,20,35).

Hidrólisis de Tween-80: Las cepas que no tienen generalmente importancia clínica son positivas a esta prueba. M. scrofulaceum y miembros del complejo M. intracellulare-avium son tween-80 negativas.

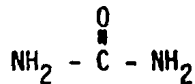
Fundamento: Ciertas micobacterias poseen una lipasa que desdobla el tween-80 (monooleato de polioxietilensorbitán) en ácido oleico y sorbitol polioxietilado, con modificación de las características ópticas de la solución que pasa del color amarillo pajizo (producido cuando la luz atraviesa la solución de tween-80 intacta) al rosado. El cambio de color en el indicador no se debe a un cambio de pH, ya que el ácido formado es neutralizado por la solución amortiguadora utilizada. El cambio de color indica la hidrólisis o destrucción del tween-80 (17,20,35).

Reducción de telurito: La capacidad de los microorganismos del grupo "Battley" para reducir con 3 días el telurito de potasio a telurio, es una prueba importante para la separación de este grupo de microorganismos de otros miembros del grupo II de Runyon. Si bien M. terrae y M. xenopei del grupo III de Runyon pueden reducir el telurito de potasio, el tiempo requerido es mayor de 5 días.

Fundamento: Las células micobacterianas reducen las sales de telurio a telurio metálico; éste actúa como un aceptor artificial de electrones y se reduce a telurio metálico de color negro, esto es realizado por la telurio reductasa presente en forma soluble en M. avium (17,20,35).

Crecimiento en Agar MacConkey: La capacidad de M. fortuitum para crecer en agar MacConkey se usa como criterio para la separación de este microorganismo de otros de rápido crecimiento. M. fortuitum se desarrolla en 5 días mientras que otras micobacterias de rápido crecimiento son inhibidas. Algunas micobacterias de rápido crecimiento pueden desarrollar en este medio a los 11 días, pero no antes de 5 días de incubación, que es cuando las colonias de M. fortuitum aparecen. (35)

Actividad de ureasa: La urea es una diamida del ácido carbónico con la fórmula:

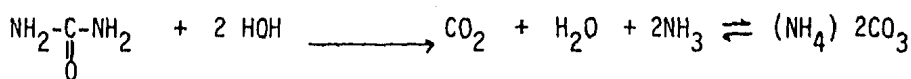


Todas las amidas se hidrolizan fácilmente con liberación de amoníaco y dióxido de carbono.

Fundamento: La ureasa es una enzima que puede hidrolizar urea; esta prueba provee un medio simple para diferenciar M. scrofulaceum de M. gordonae.

Es útil para separar a M. gastri de los otros miembros del grupo III de micobacterias fotocromógenas (17,38).

Reacción química:



Producción de pigmentos: La pigmentación de colonias jóvenes de micobacterias, desarrollada en la obscuridad e inducida por exposición a la luz, pueden ser una característica importante en la identificación de ciertas especies de micobacterias.

Fundamento: La presencia de pigmentación en las micobacterias, es el resultado de la producción de cristales de caroteno por parte de las micobacterias de metabolismo activo (17,20,35).

#### f.7) Medidas de seguridad

El mayor riesgo potencial de infección por micobacterias para el personal del laboratorio, reside en la formación de aerosoles, por lo cual es preciso utilizar una cabina de seguridad para transferir muestras de expectoración u otro tipo de muestras a los tubos de centrifuga, preparar extendidos para la tinción e inocular cultivos. Se debe evitar cualquier contacto con superficies contaminadas. En todas las áreas de trabajo se deben instalar recipientes conteniendo desinfectantes efectivos, como: mezclas fenólico-jabonosas que emplean o-fenilfenol u otros derivados fenólicos, con periodos de contacto de 10-30 minutos; formaldehído, al 3-8%; glutaraldehído alcalino al 2%; fenol al 5-10% (17,20).

## PARTE EXPERIMENTAL

## a) Material

agitadores

algodón

anillo de fierro

asas

embudo de filtración

frascos

gasa

gradillas

jeringas

matraces de fondo plano (2,000 ml)

matraces Erlenmeyer (250,500 y 1,000ml)

mecheros

membranas Millipore de 0.45  $\mu$ m (tipo HA)

palillos

papel filtro

pinzas millipore

pipetas Pasteur

pipetas graduadas (1,5, y 10 ml)

portafiltros

portaobjetos

probetas (100 ml)

soporte universal

tela de asbesto

tubos con tapón de rosca de 12 X 75 mm

tubos con tapón de rosca de 16 X 125 mm

tubos con tapón de rosca de 20 X 150 mm

vasos de precipitados de 500 y 1,000 ml

b) Equipo

autoclave

baño María en agitación

campana de flujo laminar

campana de extracción

centrífuga

horno a 70°C

microscopio

c) Reactivos

anilina (Merck, México)

aceite de inmersión (Merck, Darmstadt, Germany)

ácido clorhídrico conc. (Merck, Darmstadt, Germany)

agua destilada

albúmina bovina (Sigma Chemical Co.)

alcohol etílico (J.T. Baker Chemical Co.)

bromuro de cianógeno (Merck, Darmstadt, Germany)

carbolfucsina (Lab. de Preparación de Reactivos, I.M.S.S.)

cloruro de azul de metileno (Merck Darmstadt, Germany)

cloruro de benzalconio (Merck, México)

cloruro de sodio (Merck, México)

diclorhidrato de n-naftiletildiamina (Eastman Chemicals)

fenol (J.T. Baker Chemical Co.)

fosfato ácido de sodio anh. (Merck, México)  
fosfato ácido de sodio (12 H<sub>2</sub>O) (Merck, Darmstadt, Germany)  
fosfato de sodio (Merck, México)  
fosfato diácido de potasio (Mallinckrodt Chemical Works)  
glicerol (J.T. Baker Chemical Co.)  
glucosa (BBL, Div. Becton, Dickinson & Co.)  
hidróxido de sodio (Merck, México)  
nitrato de sodio (J.T. Baker Chemical Co.)  
nitrito de sodio (Mallinckrodt Chemical Works)  
peptona (Difco)  
peróxido de hidrógeno (30%) (Merck Darmstadt, Germany)  
rojo de fenol (sodio) (Merck Darmstadt, Germany)  
sulfanilamida (J.T. Baker Chemical, Co.)  
Tween- 80 (Biochemicals Corporation)  
urea (Merck, México)

d) Medios de cultivo

Base de Dubos (Baltimore Biological Laboratory)  
Base de Lowenstein-Jensen (E. Merck Darmstadt, Germany)  
Medio de MacConkey (BBL, Div. Becton, Dickinson & Co.)

e) Técnicas empleadas

Las muestras de expectoración fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (I.N.E.R.), obtenidas de pacientes con diagnóstico de tuberculosis. En el mismo Instituto se les realizó tinción fluorocrómica para la observación de bacilos ácido-alcohol resistentes.

### Tinción fluorocrómica.-

- Se realiza un extendido del material en la superficie del portaobjetos, tratando de dejar una capa gruesa (frotis grueso), El frotis se fija por calentamiento sobre la flama.
- Se cubre el extendido con auramina fenólica y se deja colorear 15 minutos.
- Se decolora con alcohol-ácido (2 minutos)
- Se cubre el extendido con permanganato de potasio al 0.5% que se deja durante 2 minutos.
- Se enjuaga con agua, se deja secar y se observa

Los frotis se examinaron con objetivo 25X utilizando una lámpara de gas de mercurio y un filtro BG-12. Las micobacterias se tiñen de color anaranjado amarillento contra un fondo oscuro.

El reporte del examen microscópico se realizó de acuerdo con lo establecido por el Comité en Revisión de Diagnóstico Estándar de la Sociedad Americana Torácica (35) (Tabla XII).

Las muestras conteniendo bacilos ácido-alcohol resistentes se descortaminaron utilizando el método del fosfato trisódico-cloruro de benzalconio (Zefirán).

### Método del fosfato trisódico-cloruro de benzalconio.-

- Se mezclan en un tubo de centrifuga estéril igual porción del digestante (fosfato trisódico-cloruro de benzalconio) y de la muestra de expectoración.
- Se agita por 30 minutos
- Se dejan los tubos en reposo durante 20 minutos a temperatura ambiente
- Se decanta el sobrenadante en un frasco conteniendo fenol al 10%
- Se resuspende en 10-20 ml de amortiguador de fosfatos estéril (1/15M) pH 6.6.

- Se centrifuga por 20 minutos a 3000 rpm
- Se decanta el sobrenadante en el frasco que contiene el desinfectante.
- Se toma aproximadamente 0.5 ml del sedimento con una pipeta Pasteur estéril y se inoculan sobre la superficie de un medio de Lowenstein-Jensen. En nuestro caso esta inoculación se realizó en 4 tubos conteniendo medio de Lowenstein-Jensen.

Todos los tubos se incubaron a 35-37°C; los que no mostraron crecimiento a las 12 semanas se desecharon y en los que sí se manifestó, se les realizó un frotis y tinción de Ziehl-Neelsen para la observación de bacilos ácido-alcohol resistentes y comprobar pureza de las cepas.

#### Tinción de Ziehl-Neelsen.-

- Se prepara un frotis cubriendo una área de 2-3cm
- Se fija el frotis por calentamiento durante dos horas o a 65°C toda la noche
- Se colocan los portaobjetos en una platina, con un pequeño pedazo de papel filtro encima.
- Se cubren con carbolfucsina
- Se calientan a vapor por 5 minutos (No hervir, ni dejar secar)
- Se retira el papel filtro y se lavan con agua destilada o de la llave
- Se decoloran con alcohol-ácido hasta que la solución corra clara (aprox. 2 min.)
- Se lavan con agua destilada o agua de la llave
- Se contrasta con azul de metileno por 30-60 seg.
- Se vuelve a lavar con agua destilada o de la llave, dejando secar y se examinan en el microscopio con objetivo de inmersión. Las micobacterias



se observan de color rojo y los microorganismos diferentes a ellas se observan de color azul.

En algunos cultivos hubo desarrollo micobacteriano y contaminación (bacteriana y/o fúngica), se volvieron a descontaminar por el método descrito anteriormente para la recuperación de las micobacterias.

La identificación preliminar de las Mycobacteria se basó en la morfología colonial, pigmentación y velocidad de crecimiento (22) (Tabla XIV)

La identificación definitiva se fundó en los resultados obtenidos en la realización de las siguientes pruebas bioquímicas:

#### Acumulación de niacina:

Técnica.- Se añade 1 ml de solución salina estéril a un cultivo con desarrollo mínimo de 4 semanas, como la niacina debe extraerse del medio de cultivo, el desarrollo no debe cubrir toda su superficie y en caso de ser así, raspar parte del desarrollo hacia un lado, a fin de permitir que la solución salina se ponga en contacto directo con el medio, se deja que cubra la superficie durante 15 a 30 minutos. Se transfieren 0.5ml de la extracción a un tubo limpio con tapón de rosca, se añaden 0.5 ml de anilina al 4% y 0.5 ml de bromuro de cianógeno al 10%. Si se extrajo la niacina del medio, aparece un color amarillo en pocos minutos. Si la prueba resulta negativa, se vuelve a incubar el cultivo durante 2 a 3 semanas a 37°C y se repite nuevamente la prueba (La prueba se realiza en una campana de extracción) (15,17,20,35).

Control positivo: M. tuberculosis

Control negativo: M. intracellulare

#### Actividad de la nitrato-reductasa:

Técnica.- Se colocan unas gotas de agua destilada estéril en un tubo estéril

TABLA XIV

IDENTIFICACION PRELIMINAR DE MYCOBACTERIA AISLADA DE MUESTRAS CLINICAS.

Caracterización inicial de micobacterias y reporte preliminar:

GRUPO RUNYON	MORFOLOGIA COLONIAL Y PIGMENTACION	REPORTE PRELIMINAR
	Colonias secas, color ante y crecimiento lento	Bacilos ácido-resistentes, parecidos a <u>M. tuberculosis</u>
I FOTOCROMO-GENAS	Crecimiento lento, colonias pigmentadas después de exponer a la luz.	Bacilos ácido-resistentes, fotocromógenos; el más comúnmente aislado es <u>M. kansasii</u>
II ESCOTOCROMOGENAS	Crecimiento lento, colonias pigmentadas sin exponer a la luz.	Bacilos ácido-resistentes cromogénicos: <u>M. gordonae</u> y <u>M. scrofulaceum</u> son los más comúnmente aislados.
III NO CROMOGENAS	Crecimiento lento, colonias húmedas, lisas y no pigmentadas.	Bacilos ácido-resistentes no cromogénicas: el más comúnmente aislado es <u>M. avium-intracellulare</u> .
IV DE CRECIMIENTO RAPIDO	Crecimiento rápido	Bacilos ácido-resistentes: <u>M. fortuitum</u> y <u>M. chelonae</u> son los más comúnmente aislados.

Tomada de: J.Clin.Microbiol., 13 (3): 470, 1981.

ril con tapón de rosca. Se toma una asada de cultivo de micobacterias y se emulsiona en el agua, se añaden 2 ml de una solución amortiguadora de nitrato de sodio (1/100 M, pH 7), se mezcla por agitación e incuba durante 2 horas a 37°C. Se agrega 1 gota de HCl 1:1, 2 gotas de solución de sulfanilamida 0.2% y 2 gotas de solución de diclorhidrato de n-naftiletilendiamina 0.1%. La aparición de color rojo se observa inmediatamente, indicando una prueba positiva. Si no hay desarrollo de color, se añade una pequeña cantidad de polvo de zinc y si aparece color rojo la prueba es realmente negativa. Si no hay desarrollo de color al agregar el zinc la prueba era positiva, pero los nitratos de la solución se redujeron hasta compuestos incoloros.

**Control positivo: M. tuberculosis**

La intensidad del color desarrollado se puede cuantificar comparando con estándares de color. Los estándares se preparan realizando 13 diluciones seriadas de una solución de  $\text{NaNO}_2$  (1/100 M). A las diluciones 6,7,8,10,11 y 13 se les agrega 1 gota de HCl 1:1, 2 gotas de diclorhidrato de n-naftiletildiamina y 2 gotas de sulfanilamida.

Tubo No.	Dilución	Estándar
6	1:64	5+
7	1:128	4+
8	1:256	3+
10	1:1024	2+
11	1:2048	1+
13	1:8192	±

Las soluciones estándares son estables por 10-15 minutos.

### Hidrólisis de Tween-80:

Técnica.- Se toma con un asa estéril un poco de desarrollo activo de un cultivo de micobacterias y se inocula en el sustrato tween-80. Se incuba a 35-37°C durante 10 días observando si hay un cambio de color de amarillo pajizo a rosa durante los primeros 3 días y luego diariamente.

Control positivo (rápido): M. kansasii

Control positivo (tardío): M. gastri

Control negativo: M. scrofulaceum

### Crecimiento en Agar MacConkey:

Técnica.- Se toma una asada de un cultivo líquido (Tween-albúmina) de micobacterias y se inocula en un medio de MacConkey. Se incuba durante 11 días a 35-37°C, revisando los cultivos a los 5 y 11 días. Se reporta como resultado positivo cuando se observa crecimiento.

Control positivo: M. fortuitum

El agar MacConkey que se utiliza no debe contener cristal violeta, ya que éste inhibe el desarrollo de todas las micobacterias.

### Actividad de catalasa:

Técnica.- Prueba directa: Se colocan 1 a 2 gotas de una solución tween-peróxido recién preparada sobre una colonia micobacteriana. Se observa durante 4 a 5 minutos para ver si hay desprendimiento de burbujas, que indica una prueba positiva. La ausencia de ellas, indica una prueba negativa.

Prueba semicuantitativa: Se inocula sobre la superficie de un medio de Lowenstein-Jensen 0.1 ml de un cultivo líquido (Tween-albúmina) de micobacterias con 7 días de desarrollo. Se incuba durante 2 semanas a 37°C.

La tapa del tubo se debe dejar floja para permitir el intercambio de aire, Se añade 1 ml de solución tween-peróxido y se deja en posición vertical durante 5 minutos. Se mide la altura de la columna de burbujas sobre la superficie del medio y se anota.

Prueba de la catalasa termoestable: Se emulsionan en un tubo 0.5 ml de amortiguador de fosfatos (1/15 M pH 7) con varias colonias del microorganismo, se coloca en baño María a 68°C durante 20 minutos, se retira y deja enfriar a temperatura ambiente. Se añaden 0.5 ml de la mezcla tween-peróxido recién preparada, observando si hay formación de burbujas y no descartándolo como negativo hasta después de 20 minutos. La formación de burbujas indica una prueba positiva y su ausencia, una prueba negativa. No se debe agitar el tubo pues la presencia de detergente en la mezcla puede dar resultados positivos falsos (17,20,35).

#### Actividad de ureasa:

Técnica.- Se toma una asada de un cultivo de micobacterias y se inocula en tubos conteniendo medio de urea, se incuba a 35-37°C durante 7 días (38), revisando diariamente. Un cambio en el color amarillo a rosa o rojo indica una prueba positiva.

Control positivo: M. fortuitum

Todas las técnicas anteriormente mencionadas, se realizaron bajo condiciones de seguridad para evitar cualquier tipo de contaminación.

La preparación de medios de cultivo y reactivos están descritos en el Anexo.

## RESULTADOS

Se estudiaron un total de 200 muestras de expectoración de pacientes con diagnóstico clínico de tuberculosis; por el estudio bacilosκόpico se encontraron 59 muestras positivas (38+++, 19++ y 2+) (Cuadro I) y del cultivo de éstas, se obtuvo desarrollo en 44, mostrando crecimiento algunas hasta después de 60 días de incubación. La identificación se hizo en forma preliminar utilizando datos de morfología colonial, pigmentación y velocidad de crecimiento, con estas observaciones de las 44 cepas aisladas 6 corresponden a micobacterias no tuberculosas y las restantes a M. tuberculosis o M. bovis (Cuadro II).

De las 44 cepas aisladas, 10 sufrieron contaminación bacteriana y/o fúngica, sin poder ser recuperadas después de volver a descontaminar.

La identificación definitiva de las cepas no contaminadas, se realizó por caracterización bioquímica, correspondiendo 4 de ellas a M. kansasii y las 30 restantes a M. tuberculosis (Cuadro III).

Se realizó la historia clínica de los 34 pacientes en quienes se aisló Mycobacterium, lográndose sólo en 29 (Cuadro IV). Los datos obtenidos se utilizaron para relacionar la frecuencia del padecimiento en cuanto a sexo (Cuadro V), edad (Cuadro VI) y ocupación (Cuadro VII). Se determinó además la evolución que presentaron los pacientes después del tratamiento (Cuadro VIII) y los padecimientos asociados con la enfermedad (Cuadro X); finalmente se correlacionó la especie de Mycobacterium identificada (Cuadro IX).

CUADRO I

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GENERO MYCOBACTERIUM  
A PARTIR DE EXPECTORACIONES

Número y grado de positividad de muestras estudiadas por baciloscopia (1)

---

Reporte:	No. de muestras
Numerosos o (+++)	38
Pocos o (++)	19
Escasos o (+)	2
Negativo o (0)	141
	—
TOTAL	200

---

(1) = De acuerdo al Comité en Revisión de Diagnóstico Estándar de la Sociedad Americana Torácica (35)

CUADRO II

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GENERO MYCOBACTERIUM  
A PARTIR DE EXPECTORACIONES

Identificación preliminar de cepas aisladas (1)

Morfología colonial	Pigmentación	Velocidad de crecimiento	No. de cepas	Microorganismo probable
colonias rugosas, secas	amarillo mate	Mayor de 60 días	9	bacilo tuberculoso
colonias rugosas, secas	amarillo mate	Entre 40-60 días	29	bacilo tuberculoso
colonias lisas	amarillo	Entre 18-22 días	6	micobacterias no tuberculosas
		TOTAL	<u>44</u>	

(1) = De acuerdo con Patrick Murray y Donald Krogstad, (22)



AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GENERO MYCOBACTERIUM  
 A PARTIR DE EXPECTORACIONES

Pruebas bioquímicas. Resultado de las especies identificadas

Cepa	Niacina	Reducción Nitratos	C A T A L A S A			Degradación Tween - 80(2)	Crecimiento Agar MacConkey	Ureasa(3)	Especie
			Semi-cuant. (1)	pH 7 68°C					
1	+	4+	28	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>	
2	+	4+	23	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>	
3	+	4+	17	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>	
4	+	3+	27	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>	
5	+	3+	23	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>	
6	+	3+	24	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>	
7	+	3+	24	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>	
8	+	4+	25	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>	
9	+	3+	36	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>	
10	+	4+	33	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>	
11	+	3+	21	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>	
12	+	3+	33	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>	

(1) = El número indica milímetros de burbujas

(2) = A los 5 días

(3) = Positiva a los 1 - 7 días

Cepa	Niacina	Reducción Nitratos	C A T A L A S A		Degradación Tween - 80(2)	Crecimiento Agar MacConkey	Ureasa(3)	Especie
			Semi-cuant. (1)	pH 7 68°C				
13	+	3+	28	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
14	+	3+	26	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
15	+	3+	30	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
16	+	4+	33	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
17	+	3+	19	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
18	+	3+	30	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
19	+	3+	28	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
20	+	4+	27	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
21	+	3+	25	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
22	+	4+	29	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
23	+	3+	30	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
24	+	3+	26	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
25	+	3+	31	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
26	+	3+	26	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>

CUADRO III (Cont.)

Cepa	Niacina	Reducción Nitratos	C A T A L A S A Semi-cuant. (1)	pH <sub>7</sub> 68°C	Degradación Tween - 80(2)	Crecimiento Agar MacConkey	Ureasa	Especie
27	+	3+	25	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
28	+	3+	30	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
29	-	4+	>50	+	-	-	+	<u>M. kansasii</u>
30	-	3+	>50	+	-	-	+	<u>M. kansasii</u>
31	-	3+	>50	+	-	-	+	<u>M. kansasii</u>
32	-	3+	>50	+	-	-	+	<u>M. kansasii</u>
33	+	4+	19	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>
34	+	3+	25	-	-	-	+	<u>M. tuberculosis</u>

CUADRO IV

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GENERO MYCOBACTERIUM  
 A PARTIR DE EXPECTORACIONES

Estudio clínico resumido de pacientes en quienes se aisló Mycobacterium

Paciente	1	2	3	4	5
S	M	M	M	M	F
E	45 años	40 años	61 años	49 años	23 años
L.O.	Edo.Nayarit	Edo.México	Edo.Querétaro	Edo.Veracruz	Edo.Chiapas
L.R.	Edo.Nayarit	Edo.México	México,DF	Edo.Oaxaca	Edo.Chiapas
O	campesino	campesino	artesano	campesino	hogar
E	analfabeta	analfabeta	3o.primaria	3o.primaria	2o.primaria
F.I.	6-V-83	14-V-83	25-VII-83	3-V-83	13-VII-83
F.E.	24-VIII-83	28-VII-83	7-IX-83	25-VII-83	23-VIII-83
T.E.	2 años	17 meses	14 meses	10 meses	9 meses
T.P.	hain,eth,sm	sin tratamiento	sin tratamiento	sin tratamiento	sm,hain,eth,rif cicl.,prot,tia.
T.I.H.	hain,eth,sm	sm,hain,eth	hain,eth,sm	sm,hain,eth	hain,rif,km,tia
M.A.	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>
C	Buena evolución	Mala evolución	Mala evolución Fallece	Mala evolución	Mala evolución

S = sexo  
M = masculino  
F = femenino  
E = edad  
L.O. = lugar de origen  
L.R. = lugar de residencia  
O = ocupación  
E = escolaridad

F.I. = fecha de ingreso  
F.E. = fecha de egreso  
T.E. = tiempo de evolución  
del padecimiento  
T.P. = tratamiento previo  
T.I.H. = tratamiento  
intrahospitalario

M.A. = micobacteria aislada  
C = comentario  
hain = hidracida del ácido  
isonicotínico  
cicl = cicloserina  
prot = protionamida

rif= rifampicina  
pia= piazolina  
sm= estreptomina  
eth= etambutol  
tia= tiacetazona  
km= kanamicina

CUADRO IV (Continuación)

Paciente	6	7	8	9	10
S	M	M	M	F	F
E	63 años	31 años	33 años	55 años	30 años
L.O.	México,D.F.	Edo.México	Edo.Veracruz	Edo.México	Edo.Guerrero
L.R.	México,D.F.	Edo.México	Edo.Veracruz	Edo.México	Edo.Guerrero
O	ninguna	albañil	ninguna	hogar	mesera
E	primaria	3o.primaria	preparatoria	analfabeta	sabe leer y escribir
F.I.	11-V-83	1-X-80	24-V-83	30-VI-83	9-VI-83
F.E.	4-VIII-83	28-V-81	21-VI-83	28-X-83	9-XI-83
T.E.	9 semanas	6 años	7 años	10 meses	41 meses
T.P.	sin tratamiento	sm,hain,eth	sm,hain,eth	sin tratamiento	sm,hain,eth
T.I.H.	sm,hain,eth	km,hain,rif,pi	sin tratamiento	sm,hain,eth	km,rif,cicl,prot
M.A.	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>
C	<u>Buena evolución</u>	<u>Malá evolución</u>	<u>Malá evolución</u>	<u>Malá evolución</u>	<u>Buena evolución</u>

CUADRO IV (Continuación)

Paciente	11	12	13	14	15
S	NO	M	M	F	M
E	FUE	33 años	42 años	53 años	48 años
L.O.		Edo. Chihuahua	Edo. México	Edo. Oaxaca	Edo. Puebla
L.R.	POSIBLE	Edo. Chihuahua	México, D.F.	México, D.F.	México, D.F.
O		impresor	albañil	hogar	pintor
E	REALIZAR	1o. secundaria	analfabeta	ninguna	5o. primaria
F.I.	LA HISTORIA	19-VII-83	30-V-83	13-VII-83	21-V-83
F.E.		5-IX-83	25-X-83	14-X-83	11-VIII-83
T.E.	CLINICA	4 años	1 año	4 meses	9 meses
T.P.		hain, sm, eth	sm, hain, eth	sin tratamiento	sin tratamiento
T.I.H.		prot, rif, cicl.	rif, cicl, treventix	sm, hain, eth	sm, hain, eth
M.A.	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>
C		<u>Mala evolución</u>	<u>Mala evolución</u>	<u>Buena evolución</u>	<u>Mala evolución</u>

CUADRO IV (Continuación)

Paciente	16	17	18	19	20
S	F	F		M	M
E	33 años	23 años	NO	22 años	60 años
L.O.	Edo. Guerrero	Sn. Luis Potosí	FUE	México, D.F.	Edo. Hidalgo
L.R.	Edo. Guerrero	Sn. Luis Potosí	POSIBLE	México, D.F.	Edo. Hidalgo
O.	hogar	hogar	REALIZAR	se desconoce	agricultor
E	2o. primaria	5o. primaria	LA HISTORIA	secundaria	se desconoce
F. I.	21-II-83	28-VI-83	CLINICA	24-V-83	23-VI-83
F. E.	7-VII-83	hospitalizada	<u>M. tuberculosis</u>	11-VIII-83	15-VII-83
T. E.	6 años	2 años		6 meses	1 año
T. P.	sm, hain, eth	sm, hain, eth		rif, hain	sin tratamiento
T. I. H.	cicl, prot, rif, hain	hain, rif, cicl, pia		sm, hain, eth	sm, hain, eth
M. A.	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>		<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>
C	Buena evolución	Buena evolución		Mala evolución	Buena evolución

CUADRO IV (Continuación)

P	21	22	23	24	25
S		M	F	F	M
E	NO	28 años	18 años	50 años	47 años
L.O.	FUE	Edo.Veracruz	Edo.Chiapas	Edo.Oaxaca	Edo.Coahuila
L.R.		Edo.México	Edo.Chiapas	Edo.Oaxaca	México,D.F.
O	POSIBLE	comerciante	hogar	hogar	chofer
E	REALIZAR	analfabeta	primaria	se desconoce	se desconoce
F.I.	LA HISTORIA	20-V-83	22-VII-83	27-VI-83	24-V-83
F.E.		30-VIII-83	hospitalizada	hospitalizada	30-VIII-83
T.E.	CLINICA	11 meses	1 año	3 meses	9 meses
T.P.		sin tratamiento	sm,hain,eth	sin tratamiento	sin tratamiento
T.I.H.		sm,hain,eth	hain,sm,eth	sm,hain,eth	sm,hain,eth
M.A.	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>
C		<u>Buena evolución</u>	<u>Buena evolución</u>	<u>Mala evolución</u>	<u>Buena evolución</u>



CUADRO IV (Continuación)

P	26	27	28	29	30
S	M	M	M	F	M
E	26 años	32 años	43 años	19 años	82 años
L.O.	Edo. Guerrero	Edo. Zacatecas	Edo. Hidalgo	Edo. Guerrero	Edo. Guerrero
L.R.	Edo. México	Edo. Zacatecas	Edo. Hidalgo	Edo. Guerrero	México, D.F.
O	vigilante	campesino	se desconoce	hogar	albañil
E	primaria	3o. primaria	4o. primaria	4o. primaria	se desconoce
F.I.	29-IV-83	22-III-83	12-V-83	13-VII-83	2-III-83
F.E.	28-VII-83	3-VIII-83	2-VIII-83	1-XI-83	21-IX-83
T.E.	21 meses	3 años	7 meses	3 años	8 meses
T.P.	sm, hain	se desconoce	sm, hain, eth	sm, hain	sin tratamiento
T.I.H.	sm, hain, eth	hain, eth, sm, rif	hain, rif, prot, kan	sm, hain, eth	hain, sm, eth
M.A.	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. tuberculosis</u>	<u>M. kansasii</u>	<u>M. kansasii</u>
C	<u>Mala evolución</u>	<u>Mala evolución</u>	<u>Mala evolución</u>	<u>Mala evolución</u>	<u>Buena evolución</u>

CUADRO IV (Continuación)

P	31	32	33	34
S	NO	M	NO	F
E	FUE	52 años	FUE	67 años
L.O.		Edo. Guerrero		México, D.F.
L.R.	POSIBLE	Edo. Guerrero	POSIBLE	México, D.F.
O		campesino		hogar
E	REALIZAR	1o. primaria	REALIZAR	se desconoce
F.I.	LA HISTORIA	6-VI-83	LA HISTORIA	26-V-83
F.E.		26-VIII-83		8-XI-83
T.E.	CLINICA	2 años	CLINICA	4 meses
T.P.		sm, hain, eth		sin tratamiento
T.I.H.		sm, hain, eth		sm, hain, eth, rif
M.A.	<u>M. kansasii</u>	<u>M. kansasii</u>	<u>M. kansasii</u>	<u>M. tuberculosis</u>
C		Mala evolución		Buena evolución

CUADRO V

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GENERO MYCOBACTERIUM  
 A PARTIR DE EXPECTORACIONES

Frecuencia de la enfermedad en relación al sexo, de acuerdo a los datos obtenidos en el estudio clínico

---

Sexo:	No. de pacientes	%
Masculino	19	65.52
Femenino	10	34.48
	29	100.00
TOTAL		

---

CUADRO VI

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GENERO MYCOBACTERIUM  
A PARTIR DE EXPECTORACIONES

Frecuencia de la enfermedad en relación a la edad, según el estudio clínico practicado

Edad;	No. de pacientes	%
Entre 18-45 años	18	62,07
Mayores de 45 años	11	37,93
TOTAL	29	100,00

CUADRO VII

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GENERO MYCOBACTERIUM  
 A PARTIR DE EXPECTORACIONES

Frecuencia de la enfermedad en cuanto a ocupación de los pacientes estudiados

Ocupación;	No. de pacientes	%
hogar	9	31.03
campesino	5	17.25
albañil	4	13.79
artesano	1	3.45
mesera	1	3.45
impresor	1	3.45
pintor	1	3.45
comerciante	1	3.45
chofer	1	3.45
vigilante	1	3.45
se desconoce	2	6.89
ninguna	2	6.89
	TOTAL	29
		100.00

CUADRO VIII

ASLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GENERO MYCOBACTERIUM  
A PARTIR DE EXPECTORACIONES

Apreciación clínica de la evolución de los pacientes después del tratamiento

---

Evolución:	No. de pacientes	%
Buena evolución	12	41.38
Malá evolución	16	55.17
Defunciones	1	3.45
	<hr/>	<hr/>
TOTAL	29	100.00

---

CUADRO IX

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GENERO MYCOBACTERIUM  
A PARTIR DE EXPECTORACIONES

Número y especies de micobacterias aisladas de pacientes con diagnóstico de tuberculosis

---

Especie:	No.	%
<u>M. tuberculosis</u>	30	88,23
<u>M. kansasii</u>	4	11,77
	<hr/>	<hr/>
TOTAL	34	100,00

---

CUADRO X

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ESPECIES DEL GENERO MYCOBACTERIUM  
 A PARTIR DE EXPECTORACIONES

Padecimientos que se encontraron asociados más frecuentemente en los pacientes estudiados

Padecimiento:	No. de pacientes :	%
ninguno (aparentemente)	9	31.03
desnutrición (II grado)	1	3.45
sangrado de tubo digestivo	1	3.45
parasitosis intestinal	5	17.24
diabetes mellitus	3	10.35
infección de vías urinarias	3	10.35
hepatopatía crónica	1	3.45
enfermedad cerebrovascular arterotrombótica	1	3.45
Mal de Pott	1	3.45
parasitosis intestinal y desnutrición (II grado)	2	6.89
parasitosis intestinal y anemia hipocrómica	1	3.45
diabetes mellitus y enfermedad cardíacaarteroesclerosa	1	3.45
	TOTAL	29
		100.00



## ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Como se mostró en los resultados, de las 200 muestras estudiadas (Cuadro I), sólo 59 fueron positivas al estudio bacilosκόpico. Se puede señalar aquí que el estudio bacilosκόpico se realiza para detectar y establecer la evolución de la enfermedad así como para valorar la eficacia de la terapia antimicrobiana. Podemos suponer que los pacientes en los cuales el estudio bacilosκόpico fue negativo, están respondiendo al tratamiento y que su evolución es satisfactoria, aunque se deben continuar realizando estudios repetidos para asegurar su eficacia.

Al verificarse la identificación preliminar (Cuadro II), tomando en consideración morfología colonial, pigmentación y velocidad de crecimiento de las cepas aisladas, 6 pertenecen a micobacterias diferentes a M. tuberculosis y las 38 restantes a micobacterias tuberculosas (M. bovis o M. tuberculosis). De éstas, 9 mostraron crecimiento aún después de 60 días, por lo cual es importante no desechar los medios antes de que tengan 10-12 semanas de incubación.

De las 44 cepas aisladas, sólo 34 se lograron identificar completamente ya que 10 mostraron contaminación bacteriana y/o fúngica, sin poder recuperarlas aun después de volver a descontaminar. El problema de la contaminación no fue posible controlarlo y la recuperación de las micobacterias no pudo realizarse, debido a que la centrifuga utilizada para tal propósito, en ese momento no estaba en condiciones óptimas, pero sí podemos determinar que con el método de descontaminación utilizado (cloruro de benzalconio-fosfato trisódico) se obtiene un buen porcentaje de recuperación de las micobacterias (74.58%).

Por lo mencionado anteriormente, sólo fue posible trabajar con 34 cepas, la identificación definitiva se basó en los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas (Cuadro III), de acuerdo a esta 30 pertenecen a M. tuberculosis; sin embargo, sería necesario realizar otras pruebas para descartar la presencia de M. bovis, ya que algunas cepas de este microorganismo pueden dar también positiva la prueba de la niacina. Las 4 restantes se identificaron como M. kansasii, microorganismo que ha adquirido mucha importancia como agente patógeno en el humano, sobre todo en los casos de enfermedad pulmonar. Esto nos da bases para considerar la importancia que tiene el aislamiento y la identificación definitiva del agente causal en los casos diagnosticados clínicamente como tuberculosis y no apoyarnos exclusivamente en el reporte bacilosκόpico.

De acuerdo con los datos obtenidos en las historias clínicas de los pacientes, se observa que la enfermedad en los casos estudiados predomina en sujetos del sexo masculino (65.52%), en comparación con el femenino (34.48%) (Cuadro V). Es importante hacer notar que de las 10 personas del sexo femenino que presentaban la enfermedad, 9 (90%) se dedican sólo a las labores del hogar, lo cual nos hace pensar en la importancia de establecer la fuente de contagio, que podría ser alguien (Cuadro VII) con quien se vive estrechamente, por lo cual debería continuar el estudio de estas personas y establecer sus posibles contactos.

Con respecto a la frecuencia de la enfermedad por edad, se observa que es mayor en sujetos entre 18-45 años (62.07%), datos que coinciden nuevamente con reportes previos. Esto nos confirma la trascendencia económica-social que tiene el padecimiento, pues ataca a sujetos en la época más productiva de su vida, aunque también se observó un porcentaje elevado en sujetos mayores de 45 años (37.93%) (Cuadro VI).

Como se indicó anteriormente, la frecuencia de la enfermedad en cuanto a ocupación (Cuadro VII) se presenta en mayor proporción en personas que se dedican a las labores del hogar (31,03%), siguiendo en importancia los campesinos (17,25%) y albañiles (13,79%). De acuerdo con los datos proporcionados por las historias clínicas (Cuadro IV) se puede ver que la enfermedad ataca a personas con escasa educación, y a las clases sociales más desamparadas, con condiciones de vida deplorables, lo que nos hace ver que la tuberculosis es un padecimiento de países pobres.

La evolución del paciente después del tratamiento nos muestra que un porcentaje alto (55,17%) (Cuadro VIII) tiene mala evolución, hecho que nos hace meditar en la importancia de la realización de las pruebas de susceptibilidad para la aplicación de una terapia eficaz. 8 pacientes (28%) están siendo tratados con más de 3 drogas antituberculosas; 1 de éstos se maneja con 7 medicamentos diferentes presentando una mala evolución; a los 7 restantes se les administran 4 productos, 4 de ellos (57,14%) con una buena evolución y 3 (42,86%) con mala. De los 8 pacientes, en 5 (62,5%) el tratamiento intrahospitalario repite al menos uno de los fármacos que fueron aplicados previamente a su hospitalización. Con estos datos creemos que es posible afirmar que existen casos en los que, ante la escasa respuesta al tratamiento, sería conveniente realizar pruebas de susceptibilidad, ya que el número de drogas administradas de ninguna manera asegura la eficacia del tratamiento. Por otro lado, 6 pacientes (20,68%) que no habían recibido tratamiento previo antes de la hospitalización, están recibiendo etambutol, estreptomina y la hidracida del ácido isonicotínico, con mala evolución, incluso falleciendo uno de ellos. Así mismo, otros 3 con tratamiento intrahospitalario a base de estreptomina, etambutol y la hidracida del ácido isonicotínico y que presentan

mala evolución, ya habían sido tratados previamente con estreptomycinina y la hidracida del ácido isonicotínico. Todos estos datos en conjunto nos hacen meditar, por un lado en el manejo poco adecuado de algunos pacientes y por otro en la posibilidad de problemas de multirresistencia frente a los fármacos utilizados, lo cual definitivamente apoya la necesidad de realizar las pruebas de susceptibilidad en estos microorganismos.

De los 34 casos estudiados, 12 (41.38%) han tenido una buena evolución.

De los 4 pacientes (11.77%) en quienes se aisló M. kansasii, 3 (75%) son originarios del Estado de Guerrero, lo cual es importante tomar en cuenta, ya que la zona geográfica y el aislamiento de una especie determinada de Mycobacterium están íntimamente relacionadas. Uno de estos 3 pacientes reside en el Distrito Federal, presentando una buena evolución; los otros 2 residen en el Edo. de Guerrero y presentan mala evolución. Cabe hacer la aclaración de que aun cuando los 3 pacientes están recibiendo el mismo tratamiento intrahospitalario (estreptomycinina, etambutol y la hidracida del ácido isonicotínico), el que ha tenido una buena evolución no fue tratado previamente, mientras que los otros dos ya habían recibido anteriormente las mismas drogas. El cuarto paciente en quien se aisló M. kansasii es del Edo. de Querétaro, no pudiendo profundizar más en su evolución por estar incompleto el expediente.

Existen algunos padecimientos asociados con la enfermedad (Cuadro X), sin embargo en 9 de los pacientes estudiados (31.03%) se encontró como única. De entre estos padecimientos se pueden citar como más comunes, la desnutrición de II grado, la parasitosis intestinal sola o aunada a otras deficiencias como anemia o la misma desnutrición y la diabetes mellitus, esta última causa predisponente para adquirir la enfermedad por M. kansasii.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los datos obtenidos se observa que:

- Además de M. tuberculosis pueden ser aisladas e identificadas micobacterias no tuberculosas de pacientes con cuadros clínicos de tuberculosis, pudiendo ser la causa del mismo.

- De acuerdo al estudio clínico se observa que:

La enfermedad predomina en el sexo masculino, comparativamente con lo reportado por otros autores quienes señalan mayor incidencia en el se xo femenino.

Se presenta la tuberculosis con mayor frecuencia en sujetos entre 18-45 años , lo cual tiene gran trascendencia económica-social pues ataca al sujeto en la época más productiva de su vida.

La enfermedad predomina en sujetos de escasa cultura y en las clases sociales más desamparadas.

El 20.68% de todos los casos estudiados que no han tenido terapia pre via, están siendo tratados a base de etambutol, estreptomycinina y la hidracida del ácido isonicotínico, con mala evolución. De igual manera, el 10.35% que han recibido tratamiento intrahospitalario con estas mismas dro gas, y ya hablan sido tratados previamente con estreptomycinina y la hidracida del ácido isonicotínico, presentan también una mala evolución.

- La única micobacteria no tuberculosa encontrada en las muestras de expec toración fue M. kansasii, siendo el 75% de ellas aisladas de personas originarias del Edo. de Guerrero. Esto nos hace señalar que, por un lado, M. kansasii quizá esté adquiriendo importancia en la etiología de la tuber culosis y por otro lado, que exista una zona endémica localizada, lo cual

corresponde a lo observado en otros países en donde se han encontrado zonas geográficas particulares para ciertas especies de micobacterias.

- Es necesario, por lo anterior, realizar el aislamiento e identificación del agente causal del padecimiento en el laboratorio, ya que los síntomas tanto de tuberculosis por M. tuberculosis como por otras micobacterias, son similares.

- Las micobacterias no tuberculosas son resistentes en forma natural a la mayoría de los antimicrobianos utilizados para el tratamiento de esta enfermedad, por lo que se ve la importancia de realizar pruebas de susceptibilidad para aplicar una terapia efectiva.

En base a las conclusiones obtenidas se pueden citar las siguientes recomendaciones:

- En todos los laboratorios de diagnóstico de tuberculosis, se debería realizar tanto el aislamiento como la identificación definitiva del agente causal de la enfermedad.

- Una vez aislado el microorganismo, realizar las correspondientes pruebas de susceptibilidad para poder aplicar la terapia efectiva y evitar tantos fracasos en el tratamiento.

- Sería importante el realizar estudios epidemiológicos en los diferentes estados de la República para determinar la frecuencia de aislamiento de especies del género Mycobacterium.

- Si todos los datos que hemos mencionado anteriormente se obtienen y son manejados correctamente por el médico y relacionados con los antecedentes clínicos del paciente, como sería tratamiento previo, lugar de origen y residencia, así como padecimientos asociados a la enfermedad, la tuber-

culosis podrá ser una enfermedad controlable en nuestro país.

## ANEXO

Preparación de medios de cultivo y reactivos;

a) Preparación de medios de cultivo;

Medio de Lowenstein-Jensen:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

fosfato diácido de potasio	2,5
sulfato de magnesio	0,24
citrato de magnesio	0,6
L-asparagina	3,6
fécula de papa	30,0
verde de malaquita	

Preparación: Disolver por completo 37,3 gramos del medio en 600 ml de agua destilada. Si se quiere aislar M. tuberculosis (var. hom.) u otras bacterias glicerófilas, es preferible añadir además 12 ml de glicerina y calentar hasta ebullición. Enfriar a 50°C y añadir 1,000 ml de huevo homogenizado. Transferir a tubos estériles con tapón de rosca. Coagular a 85°C durante 45 min. en posición inclinada. Incubar a 35-37°C para probar esterilidad, durante toda la noche. Repetir nuevamente la operación.

Base del Medio de Dubos:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

tripticase	0,5
asparagina	2,0
fosfato monopotásico	1,0
fosfato de sodio	2,5
citrato férrico amoniacal	0,05
sulfato de magnesio	0,01
cloruro de calcio	0,0005
sulfato de zinc	0,0001

Agar MacConkey sin cristal violeta:

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

peptona (Gelysate)	17,0
peptona (Polypeptone)	3,0



lactosa	10,0
sales biliares	5,0
cloruro de sodio	5,0
agar	12,0
rojo neutro	0,04

pH  $\pm$  7,4

Preparación: Hacer una suspensión con 52 gramos del material deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar hasta obtener una suspensión uniforme. Calentar ligeramente, agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar el medio a 45°C y vertir en cajas Petri. Dejar solidificar e incubar para probar esterilidad.

#### Caldo de urea:

El medio utilizado para la realización de la prueba de la ureasa en micobacterias, no es un medio comercial, pero se puede preparar en el laboratorio, según fórmula de Steadham (38).

Fórmula en gramos por litro de agua destilada

peptona	1,0
dextrosa	1,0
cloruro de sodio	5,0
fosfato de potasio	0,4
urea	20,0
sol. de rojo de fenol (1%)	1,0 ml
tween-80	0,1 ml

pH  $\pm$  5,8

Preparación: Todos los reactivos anteriores se disuelven en el agua y la solución obtenida es esterilizada por filtración. Se transfiere 1.5 ml del medio en tubos estériles. Se incuba a 35-37°C durante toda la noche para probar esterilidad. Se refrigeran a 4°C, son estables hasta por 2 meses.

#### b) Preparación de reactivos:

##### auramina fenólica:

auramina O	0,1 g
etanol (90-95°C)	100,0 ml

fenol	3,0 g
agua destilada	87,0 ml

Disolver la auramina O en el etanol y el fenol en el agua destilada. Mezclar ambas soluciones. Vaciar en un frasco ámbar,

**Alcohol ácido (tinción fluorocrómica) :**

Se añaden 0.5 ml de HCl concentrado a 100 ml de alcohol al 70%.

Permanganato de potasio 0,5%;

Se disuelven 0,5 g de permanganato de potasio en 100 ml de agua destilada. Envasar.

**Carbolfucsina:**

fucsina básica	3,0 gr
alcohol etílico (95%)	100,0 ml
fenol	5,0 gr
agua destilada	100 ml

Disolver el fenol en el agua destilada y la fucsina básica en el alcohol etílico. Mezclar 10 ml de la solución alcohólica de fucsina y 90 ml de la solución acuosa de fenol. Envasar.

**Alcohol etílico (Tinción de Ziehl-Neelsen):**

Agregar 3 ml de ácido clorhídrico concentrado a 97 ml de alcohol etílico (95%). Envasar.

**azul de metileno:**

Disolver 0,3 gramos de cloruro de azul de metileno en 100 ml de agua destilada. Envasar

**Fosfato trisódico- cloruro de benzalconio (Zefirán):**

cloruro de benzalconio	17 gr (en 100 ml de agua destilada)
fosfato trisódico.12 H <sub>2</sub> O	1000 gr
agua destilada	4100 ml

Disolver el cloruro de benzalconio en 100 ml de agua destilada y el fosfato trisódico en 4,000 ml de agua destilada caliente. Agregar 7.4 ml de la solución de cloruro de benzalconio a la solución de fosfato trisódico. Envasar.

**Amortiguador de fosfatos (1/15 M, pH 6.6):**

fosfato ácido de sodio (anh)	9.47 gr
fosfato diácido de potasio	9.08 gr

agua destilada 2,000,00 ml

Disolver cada una de las sales por separado en 1,000 ml de agua destilada. Tomar 625 ml de la solución de fosfato diácido de potasio y mezclar con 375 ml de la solución de fosfato ácido de sodio, Ajustar el pH, si es necesario.

Anilina al 4%:

Añadir 4 ml de anilina incolora a 96 ml de etanol (95%). Mezclar y conservar en un frasco ámbar, en refrigeración. Si la solución cambia de color, descartarla y preparar una solución fresca.

Bromuro de cianógeno al 10%:

Disolver 5 gramos de bromuro de cianógeno en 50 ml de agua destilada. El bromuro de cianógeno es un gas lacrimógeno y se debe manipular en una campana de extracción. En soluciones ácidas el bromuro de cianógeno puede hidrolizarse a ácido cianhídrico, muy tóxico. Descartar la solución que contenga bromuro de cianógeno en germicidas con NaOH al 2-4%.

Solución amortiguadora de nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$  1/100M, fosfatos 1/45M, pH 7):

nitrato de sodio	0.085 g
fosfato diácido de potasio	0.117 g
fosfato ácido de sodio .12 $\text{H}_2\text{O}$	0.485 g
agua destilada	100.0 ml

Disolver cada una de las sales en el agua destilada. Conservar a 4°C.

sulfanilamida al 0.2%:

Disolver 0.2 gr de sulfanilamida en 100 ml de agua destilada. Conservar a 4°C. Si hay cambio de color descartar la solución y volver a preparar una solución fresca

Solución de nitrito de sodio (1/100 M):

Disolver 0.14 gr de nitrito de sodio en 200 ml de agua destilada. Conservar en refrigeración.

Solución de Tween-peróxido:

Se prepara una solución al 10% de tween 80 y se esteriliza durante 10 minutos a 121°C y se conserva a 4°C. En el momento de utilizar, mezclar volúmenes iguales de peróxido de hidrógeno al 30% y tween-80 al 10%. Descartar la mezcla tween-peróxido que no se utilice ya que es muy inestable.

## BIBLIOGRAFIA

1. Anh C., Lowell J., Ahn S., Hurst G.; Chemotherapy for pulmonary disease due to Mycobacterium kansasii: efficacies of some individual drugs; Rev. Infect. dis. 3 (5): 1028-1034, 1981.
2. BBL, Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos; Becton, Dickinson de México, S.A. de C.V., México 1971.
3. Butler W., Kilburn J.; Improved method for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide; J. Clin. Microbiol. 16(6): 1106-1109, 1982.
4. Calderón P., La importancia clínica de las Mycobacteria diferentes de M. tuberculosis; Tesis, Fac. de Química, 1982.
5. Casal M., Rodríguez F.; Simple, new test for rapid differentiation of the Mycobacterium fortuitum complex; J. Clin. Microbiol. 13 (5): 989-990, 1981.
6. Dutt A., Stead W.; Present chemotherapy for tuberculosis; J. Infect. dis. 146 (5): 698-704, 1982.
7. Engel H., Berwald L., Lindeboom B., Havelaar A.; Mycobacterium kansasii infections in the Netherlands; A. brief summary; Rev. Infect. dis. 3 (5): 1024, 1981.
8. Estrada S.; La respuesta inmunológica y la tuberculosis; Sal. Púb.Méx. 25 (4): 403-409, 1983.
9. García S., Iscla A., Perales A.; Clasificación e identificación del género Mycobacterium; Rev. Lat. Amer. Microbiol. 19 (2), 1977.
10. Good C.; Nontuberculous Mycobacteria; Clinical Microbiol. Newsletter 1 (20), 1979.
11. Good R., Snider D.; Isolation of nontuberculous Mycobacteria in the United States 1980; From the Centers for Disease Control; J. infect. dis. 146 (6): 829-833, 1982.
12. Grange J.; Mycobacterial diseases; Edward Arnold (Publishers); 1a.Ed. London 1980.
13. Higuera F., Anguiano V., Bautista A.; Tratamiento de la tuberculosis; Infectología 1 (1): 74-82, 1981.
14. Jenks P.; The epidemiology of opportunist Mycobacterial infections in the Wales, 1952-1978; Rev. Infect. dis. 3 (5): 1021-1023, 1981.

15. Joklik W., Willett H., Amos D.; Zinsser Microbiología; Ed. Médica Panamericana, 17a. Ed., Buenos Aires, 1983.
16. Kleeberg H.; Epidemiology of Mycobacteria other than tubercle bacilli in South Africa; Rev. Infect. dis. 3 (5): 1008-1012, 1981.
17. Koneman E., Allen S., Dowell V., Sommers H.; Diagnóstico Microbiológico; Ed. Médica Panamericana 1983.
18. Kuse F., Kurasawa T., Bando K., Lee Y., Maekawa N.; In vitro and in vivo susceptibility of atypical Mycobacteria to various drugs; Rev. infect. dis. 3 (5): 885-897, 1981
19. Lederer E., Adam A., Ciobaru R., Petit J., Wietzerbin J.; Cell walls of Mycobacteria and related organism; chemistry and immunostimulant properties; Molecular & Cellular Biochemistry 7(2): 87-102, 1975.
20. Lennette E., Spaulding E., Truant J.; Manual of Clinical Microbiology, Second Edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1974.
21. Manual de Microbiología, E. Merck, Darmstadt (R.F. de Alemania).
22. Murray P., Krogstad D.; Preliminary identification of Mycobacteria isolated from clinical specimens; J. Clin. Microbiol. 13 (3): 468-471, 1981.
23. Myrvik W., Pearsall N., Weiser R.; Bacteriología y Micología Médicas; Ed. Interamericana, 1a. ed. 1977.
24. Neimeister R.; Technique for extracting niacin from Mycobacterium tuberculosis cultured on 7H10-7H11 agars; J. Clin. Microbiol. 15(5): 971-972, 1982.
25. Nel E.; Mycobacterium avium-intracellulare complex serovars isolated in South Africa from humans, swine, and the environment; Rev. Infect. dis. 3 (5): 1013-1020, 1981.
26. Pacheco C., Olvera R., Herrera M.; Panorama epidemiológico y Control de la tuberculosis en la República Mexicana; Sal.Púb.Méx. 23 (3): 251-259, 1980.
27. Pacheco C., Olvera R., Herrera M.; Blancarte L., Jiménez H.; Tratamiento antituberculoso de corta duración, 117 (1): 35-38, 1981.
28. Pezzia W., Raleigh J., Bailey M., Toth E., Silverblatt J.; Treatment of pulmonary disease due to Mycobacterium kansasii: Recent experience with rifampin; Rev. Infect. dis. 3(5) : 1035-1039, 1981.
29. Powell B., Steadham J.; Improved technique for isolation of Mycobacterium kansasii from water; J. Clin. Microbiol., 13 (5): 969-975, 1981.

30. Ramakrishnan C.; Pulmonary disease due to atypical Mycobacteria; A retrospective study from South India; Rev, Infect, dis, 3 (5): 1090-1092, 1981.
31. Saravia R.; Patogenia de la tuberculosis; alteraciones en la regulación de la respuesta inmune; Rev, Fac, Med, Méx, 25 (11): 526-530, 1982.
32. Secretaría de Salubridad y Asistencia, Subsecretaría de Salubridad, Dirección General de Control de la tuberculosis y de las Enfermedades del Aparato Respiratorio, Informe de Labores, México, 1979.
33. Silcox V., Good R., Floyd M.; Identification of clinically significant Mycobacterium fortuitum complex isolates; J. Clin. Microbiol. 14(6): 686-691, 1981.
34. Sjogren I., Nontuberculous Mycobacteria in Sweden; A brief summary; Rev, Infect, dis, 3 (5): 1084, 1981.
35. Sommers H., Rusell J.; The clinically significant Mycobacteria: Recognition and Identification; American Society of Clinical Pathologists Commission on Continuing Education, Chicago, Illinois, Second Edition.
36. Sriyabhaya N., Wongwatana S.; Pulmonary infection caused by atypical Mycobacteria; A report of 24 cases in Thailand; Rev, Infect, dis, 3 (5): 1085-1089, 1981.
37. Steadham J.; High-catalase strains of Mycobacterium kansasii isolated from water in Texas; J. Clin, Microbiol. 11 (5): 496-498, 1980.
38. Steadham J.; Reliable urease test for identification of Mycobacteria; J. Clin. Microbiol. 10 (2): 134-137, 1979.
39. Timpe A., Runyon E.; The relationship of "atypical" acid-fast bacteria to humans disease: A preliminary report; J. Lab. Clin. Med, 44 : 202-209, 1954.
40. Tsukamura M.; A review of the methods of identification and differentiation of Mycobacteria; Rev, Infect, dis, 3 (5) : 841-861, 1981.
41. Tsukamura M.; Relationship between photochromogenicity and test temperature in Mycobacteria; J. Clin. Microbiol. 14 (2): 225-226, 1981.
42. Tsukamura M., Shimoide H., Kita M., Kawakami K., Ito T., Nakajima N., Kando H.; Epidemiologic studies of lung disease due to Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis in Japan; Rev. Infect, dis, 3 (5): 997-1007, 1981.
43. Wallace R., Jones D., Wiss K.; Sulfonamide activity against Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonae; Rev. Infect. dis, 3(5): 898-904, 1981.
44. Wallace R., Swanson J., Silcox V., Good R.; Disk diffusion testing with polymyxin and amikacin for differentiation of Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonae; J. Clin. Microbiol. 16 (6): 1003-1006, 1982.

45. Wallace R., Wiss K., Bushby M., Hollowell D.; In vitro activity of trimethoprim and sulfamethoxazole against the nontuberculous Mycobacteria; Rev. infect. dis. 4 (2): 326-330, 1982.
46. Witzman I., Osadczył D., Corrado M., Karp D.; Mycobacterium thermoresistibile: a new pathogen for humans; J.Clin.Microbiol. 14 (5): 593-595, 1981.
47. Welch D., Kelly M.; Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium fortuitum complex; Antimicrobiol. ag. chemother. 15 (6): 754-757, 1979.
48. Wolinsky E.; Nontuberculous Mycobacteria and associated diseases; Am. Rev.Res.dis. 119: 107-159, 1979.
49. Zimmer B., De Young D., Roberts G.; In vitro synergistic activity of ethambutol, isoniazid, kanamycin, rifampin, and streptomycin against Mycobacterium avium-intracellulare complex; Antimicrobiol. ag.chemother 22 (1): 148-150, 1982.