

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**FACULTAD DE QUIMICA**



---

---

**LA IMPORTANCIA CLINICA DE LAS  
MYCOBACTERIA DIFERENTES DE  
M. tuberculosis.**

**TRABAJO MONOGRAFICO**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A:**

**PATRICIA CALDERON GOMEZ**

**MEXICO, D. F.**

**1982**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

LA IMPORTANCIA CLINICA DE LAS MYCOBACTERIA DIFERENTES DE  
M. tuberculosis

CAPITULO I

<u>GENERALIDADES.</u>	1
1.- Taxonomía.	1
2.- Caracteres diferenciales del género Mycobacterium.	2
2.1 Acido-resistencia.	
2.2 Composición química de la pared celular.	
2.3 Composición de lípidos.	
2.4 Producción de pigmentos.	
2.5 Biosíntesis de ácido nicotínico.	
3.- Nutrición, nutrientes y su asimilación.	8
3.1 Fuentes de carbono.	
3.2 Fuentes de nitrógeno.	
3.3 Elementos inorgánicos.	
3.4 Asimilación y transporte de hierro.	
3.5 Desarrollo in vitro. Observaciones generales.	
4.- Diagnóstico bacteriológico de las Micobacteriosis.	30
4.1 Tipo de especímenes y métodos de descontaminación y con- centración.	
4.2 Medios de cultivo.	
4.3 Pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación de- las Mycobacteria.	
5.- Pruebas de susceptibilidad a drogas.	40

CAPITULO II

<u>MÉTODOS DE CLASIFICACION DE LAS MYCOBACTERIA.</u>	45
1.- Clasificación de Runyon.	45
2.- Clasificaciones adansonianas.	46
3.- Métodos químicos utilizados para la clasificación de Myco- bacteria no tuberculosa.	57

4.- Clasificación actual.	60
---------------------------	----

### CAPITULO III

<u>PATOLOGIA.</u>	68
-------------------	----

1.- Enfermedad pulmonar.	69
--------------------------	----

- 1.1 Consideraciones clínicas.
- 1.2 Condiciones predisponentes.
- 1.3 Diagnóstico.
- 1.4 Patogenia.
- 1.5 Enfermedad pulmonar asociada con especies menos comunes.
- 1.6 Epidemiología.

2.- Linfadenitis micobacteriana.	79
----------------------------------	----

- 2.1 Consideraciones clínicas.
- 2.2 Diagnóstico.
- 2.3 Agentes etiológicos.
- 2.4 Patogénesis.
- 2.5 Tratamiento.

3.- Infecciones micobacterianas en tejidos blandos.	84
---	----

- 3.1 Lesiones nodulares cutáneas diseminadas y multicéntricas.
- 3.2 Abscesos localizados.
- 3.3 Abscesos formados después de un tratamiento o de cirugía.
- 3.4 Abscesos locales cutáneos.
- 3.5 Granulomas cutáneos y úlceras.
- 3.6 Tratamiento.

4.- Infecciones en huesos y articulaciones.	93
---	----

- 4.1 Sinovia, tendones y bursa.
- 4.2 Médula ósea.
- 4.3 Infecciones dentales.
- 4.4 Osteomielitis esternal después de cirugía de corazón.

5.- Enfermedad en tracto genitourinario.	99
--	----

6.- Infección diseminada.	101
---------------------------	-----

7.- Infecciones en otros tejidos. Meningitis e infecciones -- oculares.	102
--	-----

CAPITULO IV

AGENTES QUIMIOTERAPEUTICOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS -  
MICOBACTERIOSIS. 105

CAPITULO V

ASPECTOS INMUNOLOGICOS DE LAS MICOBACTERIOSIS. 111

1.- Pruebas cutáneas diferenciales. 111

2.- Efecto de la vacunación con BCG en la protección contra otras enfermedades micobacterianas. 113

3.- Papel del macrófago en la tuberculosis. 115

3.1 Cambios morfológicos en los macrófagos infectados con bacilo tuberculoso.

3.2 Cambios bioquímicos en los macrófagos infectados con bacilo tuberculoso.

3.3 Acción de esteroides adrenales y radiaciones sobre la -- función de macrófagos.

4.- Activación de la vía alterna del complemento por Mycobacteria y factor cordón. 120

5.- Inmunoterapia de cáncer experimental con Mycobacteria. 121

CAPITULO VI

RESUMEN Y COMENTARIOS. 124

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA. 129

APENDICES.

Apéndice A. 145

Medios de cultivo utilizados en el aislamiento de Mycobacteria.

- 1.- Medio de Lowenstein-Jensen.
- 2.- Agar de Middlebrook y Cohn 7H10.

- 3.- Caldo de Middlebrook 7H9.
- 4.- Agar con ácido oléico de Dubos.

Apéndice B.

149

Procedimientos de Laboratorio utilizados en el diagnóstico.

- 1.- Colección y manejo de especímenes clínicos.
- 2.- Procedimientos de laboratorio para microscopía.
- 3.- Procedimientos de laboratorio para el aislamiento.
- 4.- Otros fluidos orgánicos.
- 5.- Tejidos.
- 6.- Incubación de cultivos.
- 7.- Tiempo de incubación.
- 8.- Inoculación en animales de laboratorio.

Apéndice C.

164

Pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación de las Mycobacteria.

- 1.- Prueba de niacina en tubo.
- 2.- Prueba de catalasa.
- 3.- Prueba de catalasa a 68°C.
- 4.- Prueba de arilsulfatasa.
- 5.- Prueba de reducción de nitratos.
- 6.- Prueba de hidrólisis de tween 80.
- 7.- Prueba de reducción de telurito.

Apéndice D.

169

Procedimientos utilizados en las pruebas de susceptibilidad a --  
drogas.

- 1.- Métodos y medios de cultivo.
- 2.- Incubación y lectura de las pruebas.
- 3.- Pruebas de susceptibilidad a drogas secundarias.

## CAPITULO I

### GENERALIDADES

#### 1.- Taxonomía.

Las Mycobacteria pertenecen a la familia Mycobacteriaceae, orden Actinomycetales y clase Schizomycetes.

En la familia Mycobacteriaceae se reconocen 2 géneros: Mycobacterium y Mycococcus, pero recientemente este último fue eliminado.

El género Mycobacterium está constituido por células en forma de bastón que raramente se ramifican bajo las condiciones ordinarias de cultivo, está caracterizado por una propiedad única de tinción, la ácido resistencia, la cual es exhibida individualmente por las células.

Las células son procariotes y están limitadas por una rígida pared. No tienen flagelos, ni pilis, cápsulas o esporas.

Fisiológicamente los miembros del género son aerobios o microaerofílicos. La especie tipo es Mycobacterium tuberculosis cepa H 37Rv. Las diferentes especies son identificadas de acuerdo a sus características coloniales, fisiológicas y propiedades bioquímicas. La estructura antigénica, la susceptibilidad a bacteriófagos, la sensibilidad a drogas y la patogenicidad en especies animales, constituyen propiedades adicionales y útiles en la identificación.

Desde que los métodos numéricos de análisis taxonómico

fueron introducidos en la Mycobacteriología, el campo se ha extendido mucho. El análisis numérico taxonómico permite la selección de las pruebas de laboratorio más útiles para discriminar entre una especie y otra.

## 2.- Características diferenciales del género Mycobacterium.

2.1.- Acido-Resistencia. Históricamente la característica diagnóstica de las Mycobacteria es la resistencia a los ácidos pero esta propiedad no es siempre suficiente para distinguirla de cultivos o cepas de Nocardia y Corynebacteria. De acuerdo con Goodfellow (36) este carácter depende de la edad del cultivo, la composición del medio y el tiempo en que se realizó el aislamiento.

Es conocido por ejemplo, que la ácido-resistencia se puede incrementar por desarrollo en un medio como el de Agar de Middlebrook 7H10 con 1% de glicerol. Fisher y Barksdale (36) demostraron que la ácido-resistencia del bacilo de la lepra podía ser removida por tratamiento de las células con piridina; sin embargo, las células identificadas inequívocamente como Mycobacterium retienen la resistencia al ácido cuando frotis fijados se ponen en contacto por 4 horas con piridina a temperatura ambiente.

Todos los miembros del género Nocardia son susceptibles al tratamiento con piridina, removiendo su ácido-resistencia.

2.2.- Composición química de la pared celular. Generalmente la capa glicopéptida está formada por enlaces alternados  $\beta$  1-4 de ácido N- acetilmurámico y N- acetilglucosamina. En las Mycobacteria, el ácido murámico no se presenta como N- acetil, sino como un derivado N- glicolil; además, en estos microorganismos el grupo amino en posición 2, no está sustituido por un grupo acetil ( - COCH<sub>3</sub> ) sino por un grupo glicolil ( -COCH<sub>2</sub>OH ).

La pared celular de las Mycobacteria contiene aminoácidos como: alanina, glutamato y ácido meso -diaminopimélico, y -- los monosacáridos arabinosa y galactosa. El grupo carboxílico -- del D- glutamato y el grupo carboxílico del ácido meso- diaminopimélico no están involucrados en el enlace peptídico.

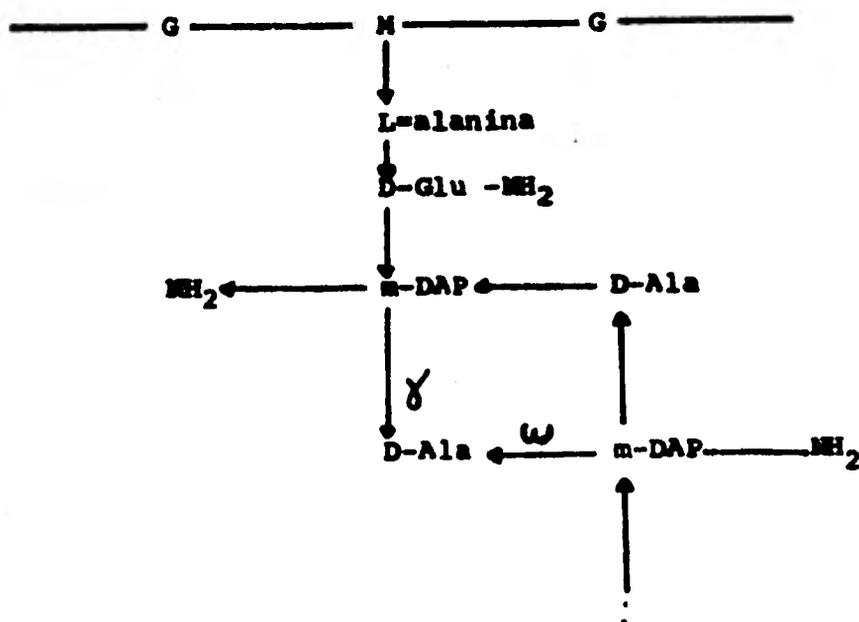


Fig. 1.- Porción de la estructura primaria de un enlace cruzado de peptidoglucano. G; Glucosamina, M; Acido murámico, L-Ala; -- alanina, D- Glu; Acido glutámico, m-Dap; Acido meso -diamino pimélico.

2.3.- Composición de lípidos. Los ácidos micólicos son largas-cadenas de  $\beta$  hidroxí-ácidos que tienen una ramificación alquili-ca en la porción alfa, estos ácidos pueden tener o no radicales-cetónicos, metoxi o carboxílico, anillos de ciclopropano con do-bles enlaces y cadenas laterales metílicas.

Las cepas de M. tuberculosis producen ácido metoximicó-lico, mientras que las cepas de M. smegmatis y M. phlei producen característicamente una variedad de ácidos micólicos con anillos de ciclopropano insaturado y cadenas laterales metílicas.

Los ácidos micólicos se han clasificado en función del número de átomos de carbono. Los constituidos por esqueletos de 80 átomos (presentes en todas las cepas del género *Mycobacterium*) se designan como ácidos micólicos en el sentido estricto; los -- que presentan esqueletos de cerca de 50 átomos, encontrados en -- el género *Nocardia* (ácidos nocardomicólicos), y los que contie-- nen 30 átomos de carbono, los cuales parecen estar asociados con ciertas cepas de *Corynebacterium* (ácidos corynomicólicos).

2.4.- Producción de pigmentos. La mayoría de los pigmentos en-contrados en las *Mycobacteria* son carotenoides o compuestos rela-cionados. La pigmentación de las colonias constituye un carác--ter taxonómico útil ( Runyon 1959 ) (110).

Sin embargo, existe variabilidad en la pigmentación-- en algunas cepas. Los carotenoides se encuentran ampliamente - distribuidos en la mayoría de las cepas saprófitas de *Mycobactg*

rium, pero también se han aislado de M. tuberculosis y M. leprae. No se puede afirmar que exista un compuesto carotenoide común a todas las cepas.

El caroteno es el componente mayor encontrado en M. kansasii y M. marinum; el licopeno es el componente principal de M. lycopenogenes y el 4-ceto caroteno es el pigmento más abundante de M. smegmatis.

La síntesis de carotenos puede ser estimulado por una exposición corta de luz, en particular con M. kansasii y M. marinum, estos microorganismos son conocidos como fotocromógenos. En otro tipo de especies con exposición a la luz o sin ella, hay producción de pigmento. A estas especies se les denomina escotocromógenas (M. phlei y M. smegmatis).

Algunas de las especies de Mycobacteria son clasificadas como no cromogénicas v.g.r. M. xenopi, M. avium, M. gastri y M. terrae, pero es probable que contengan por lo menos trazas de carotenoides. Cantidades diminutas de polienos coloreados se han encontrado en mutantes aparentemente no pigmentadas v.g.r. M. kansasii var. album.

La producción de carotenos se puede incrementar por medio de la exposición a la luz ultravioleta o uso de N-nitrosometil urea como agente mutagénico (esto ha sido observado en M. phlei).

La función de los carotenoides no está aún bien defini-

da, pero representa una ventaja cuando el *Mycobacterium* se desarrolla en el medio ambiente. Tsukamura (136) encontró que las cepas fuertemente pigmentadas como *M. kansasii* (escotocromógenas) están más capacitadas para soportar los efectos de la luz ultravioleta, que las menos pigmentadas.

2.5.- Biosíntesis de ácido nicotínico. En las investigaciones sobre la biosíntesis de las vitaminas del complejo B en *M. tuberculosis* y *M. bovis*, Pope y Smith (4) notificaron que la cantidad de ácido nicotínico encontrado en filtrados libres de células -- era mucho más alta en *M. tuberculosis* y que, comparando posteriormente con otras cepas de *Mycobacteria*, la cantidad total de ácido nicotínico producido indicaba que *M. tuberculosis* era el mayor productor. La acumulación de niacina constituye una prueba de diagnóstico entre especies. Posteriormente esta prueba se ha convertido en una de las más importantes usadas en *Mycobacteriología*.

La niacina es un componente de las coenzimas NAD y NADP que juegan un papel vital en los mecanismos de óxido-reducción de todas las células vivas. En el hombre y otros animales es un requerimiento de la dieta, en los demás organismos, incluyendo bacterias, constituye un factor de crecimiento. En las *Mycobacteria*, el NAD y NADP parecen ser sintetizados del ácido nicotínico o de un ácido quinolínico endógeno.

En este género el triptofano no es precursor de niacina. El mecanismo de la producción excesiva de ácido nicotínico por M. tuberculosis ha sido estudiado por Konno, Dudley y Willet (4).

De acuerdo con Konno (37), los extractos libres de células de M. tuberculosis, son incapaces de convertir la niacina en el correspondiente mononucleótido, en contraste con extractos de otras cepas de Mycobacteria (cepas de escotocromógenos). El exceso de niacina acumulada se debe seguramente a un bloqueo, lo cual da como resultado la incapacidad de utilizar el ácido nicotínico endógeno. En la reacción 5 y 6 de la figura 2, en donde el ATP se encuentra limitado, es donde posiblemente, se efectúe el bloqueo.

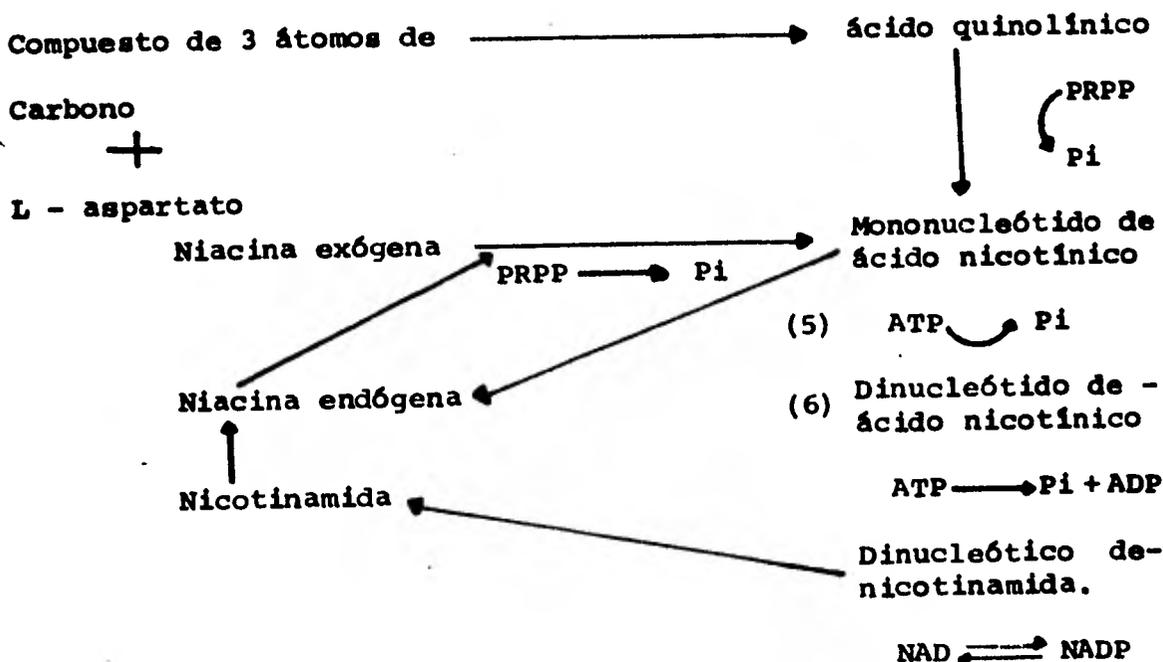


Fig. 2.- Biosíntesis de NAD y NADP en las Mycobacteria.

### 3.- Nutrición, nutrientes y su asimilación.

3.1.- Fuentes de carbono. Long (22) revisó con detalle las fuentes de carbono y nitrógeno que las Mycobacteria podían utilizar.- La más importante fuente de carbono para el desarrollo satisfactorio para la mayoría de las Mycobacteria es el glicerol. Otras -- fuentes de carbono, tales como glucosa, fructuosa, acetato, piruvato, citrato o propanol, pueden ser utilizadas por algunas Mycobacteria pero no por todas.

También se ha reportado la utilización de sacarosa, succionato, malato, malonato, fumarato y butanol, pero en muy pocas especies. La capacidad de utilización de estos sustratos tiene -- importancia tanto taxonómica como diagnóstica.

Tepper (22) observó que M. phlei, cuando desarrolla en un medio conteniendo glucosa como fuente de carbono, no muestra -- ninguna diferencia en relación con la síntesis de DNA o de proteínas, que cuando desarrolla en un medio que contenga glicerol. Pero se observa que cuando el glicerol es la fuente de carbono, -- existe un incremento en la producción de lípidos y materiales de reserva como glucógeno y aumenta el peso seco de las células.

La utilización de hidrocarburos y por especies de Mycobacteria (M. smegmatis, M. phlei, M. fortuitum, M. marinum y M. tuberculosis) fueron estudiadas por Lukins y Foster (22). Todas estas especies pueden emplear alkanos de C<sub>12</sub> a C<sub>16</sub>; todos, excepto M. tuberculosis que, puede utilizar alkanos abajo de C<sub>9</sub>. So-

lamente M. smegmatis metaboliza hidrocarburos gaseosos, n- propano, n- butano, n- pentano, pero no todos desarrollan sobre hexano, heptano u octano. M. marinum es posible que desarrolle sobre isopropil - benceno, n- butilbenceno y ter- butilbenceno.

Beam y Perry (22) encontraron que M. vaccae podía utilizar, no solamente N- tetradecano, sino también n- dodecilciclohexano y n- heptadecilciclohexano, pero no pueden desarrollar sobre ciclohexano y otros hidrocarburos cíclicos alifáticos.

Davis y Krassilnikov han descrito otras Mycobacteria como M. parafficum y M. ceroformans que utilizan hidrocarburos o emplean alkanos de cadena larga ( $C_{10}$  a  $C_{18}$ ) y etano a bajas concentraciones como el encontrado en ciertas tierras. Wayne (22) describió a M. parafficum como una especie del complejo de M. scrofulaceum pero Krassilnikov encontró que los ácidos micólicos de M. laccolum var. aliphaticum contenían de 30 a 40 átomos de carbono y estos ácidos son semejantes a los aislados en el género Corynebacteria, lo que significa que este tipo de bacterias no pertenecen al género Mycobacterium.

La utilización de diferentes fuentes de carbono por Mycobacteria no patógenas, de las que existen en el medio ambiente fuera de un huésped, han sido poco estudiadas.

Lukins y Foster (22) encontraron que algunas cepas de M. smegmatis, M. marinum y M. fortuitum pueden existir como quimiolitótrofos utilizando  $CO_2$  e  $H_2$  molecular como fuente de carbono.

no y energía; otro tipo de ion que también utilizan es el amonio. Kazda (22) encontró que los patógenos potenciales M. intracellulare y M. avium es posible que sobrevivan, creciendo lentamente en aguas estancadas o charcos.

3.2.- Fuentes de nitrógeno. Pueden servir para el desarrollo varias fuentes de nitrógeno; algunas especies pueden utilizar nitrato o nitrito como única fuente, y esto comúnmente es empleado como método de identificación.

La mayoría de las especies utiliza sales de amonio; sin embargo, la velocidad de desarrollo puede incrementarse utilizando amoniácidos o amidas como fuente de nitrógeno. En particular, la asparagina, glutamato y aspartato son buenos estimuladores del desarrollo (Youmans y Youmans) (175); la asparagina se prefiere ampliamente como fuente de nitrógeno y los átomos de nitrógeno del grupo amino y amido son incorporados a los constituyentes celulares, así como los átomos de carbono. Sin embargo, existe una pequeña diferencia entre el desarrollo de M. tuberculosis sobre un medio que contiene asparagina o cloruro de amonio, cada uno con 5 mM; la mejor fuente de nitrógeno después de una serie de pruebas parece ser la alanina. La asparagina es utilizada ineficientemente, y desaparece del medio de cultivo rápidamente cuando se utilizan bajas concentraciones (lo usual es usar 40 mM), los cultivos que contienen solamente asparagina muestran rápidamente una deficiencia de nitrógeno.

Además, estos cultivos tienen una fuente de nitrógeno orgánico - insuficiente que no va de acuerdo al desarrollo. Winder y Rooney (22) encontraron que la concentración crítica de nitrógeno era de 15 a 35 mM, y que debajo de ésta, el desarrollo de M. bovis - BCG era muy limitado.

Los experimentos realizados hasta la fecha, sólomente nos indican que la asparagina no puede actuar como una fuente de nitrógeno adecuada. Tarnok (22) hizo una interesante observación; la actividad de la asparaginasa era inhibida por la presencia de glicerol, pero no por la utilización de glutamato. Estos resultados indican que la utilización ineficiente y la rápida desaparición de bajas concentraciones de asparagina se deben a un metabolismo inadecuado por parte de la enzima asparaginasa. Los resultados de Tarnok, sin embargo, no explican porque la fase -- lag de M. tuberculosis se reduce de 14 a 10 días cuando el glutamato se sustituye por asparagina en un medio que contienen glicerol.

Bajo estas circunstancias, el glutamato es utilizado - durante las fases iniciales de desarrollo, mientras que el glicerol comienza a ser empleado cuando la velocidad de desarrollo está establecida. Bowles y Segal (22) mostraron que la glucosa -- cuando está presente con otras fuentes de carbono, es inhibitoria para el desarrollo, y que, cuando se añade citrato, no ejerce ninguna influencia sobre la utilización de otras fuentes car-

bonadas. Tepper (22) concluye que la mejor fuente de nitrógeno para M. phlei es el glutamato. Iwainsky y Schrt (22) indican - que, en M. smegmatis, alanina y  $\gamma$  amino butirato son mejores - como fuentes de nitrógeno que la asparagina o el glutamato.

Las amidas, incluyendo la urea, son utilizadas por al gunas especies como fuente de nitrógeno, y en algunos casos, la acetamida como fuente de carbono. La capacidad para hidrolizar ciertas amidas, especialmente la urea, nicotínamida y pirazina- mida, es frecuentemente usada como criterio taxonómico.

3.3.- Elementos inorgánicos. Los requerimientos de elementos inorgánicos mayores como son: potasio, fósforo (como  $PO_4^{3-}$  o  $PO_3^{2-}$ ), magnesio, azufre (como  $SO_4^{2-}$ ), para el máximo desarro- llo de las Mycobacteria, han sido conocidos desde hace tiempo.- De los cuatro mencionados, sólomente el potasio no ha sido inves- tigado con mucho detalle.

La utilización de  $P^{32}$  (como  $PO_4^{3-}$ ) ha sido examinada- en función de su distribución en constituyentes celulares, (pen- tosas, hexosas, nucleótidos, NAD y NADP) e inclusive ha sido -- cuantificado. La utilización de fósforo puede ser inhibida se- veramente por el arsenato, la azida, los agentes antituberculo- sos (la hidrazida del ácido isonicotínico, ácido p- aminosalicí- lico, estreptomina, isoxil y etambutol), en general, tienen - poco efecto, excepto a altas concentraciones.

La utilización de  $P^{32}$  para la síntesis de fosfolipi--

dos, particularmente cardiolipina y fosfatidiletanol amina; ha sido bien estudiada. Spitznagel y Sharp (22) encontraron que un agotamiento en las concentraciones de magnesio causa una ramificación de las células, posiblemente por alteraciones en la síntesis de pared celular.

Los gránulos de polifosfato no se forman en cultivos con deficiencia de magnesio: sin embargo, se observan vacuolas de lípidos. La deficiencia de sulfato causa un cese en la síntesis de DNA y proteínas, pero no afecta la producción de RNA; como consecuencia de esto las células no se dividen y tienden a ser muy elongadas. Estas formas elongadas se observan en M. smegmatis por una deficiencia de hierro; esto también se ha observado en E. coli.

Los requerimientos de elementos menores o trazas de elementos por las Mycobacteria, son probablemente idénticos a los requeridos por otras bacterias, pero no todas ellas requieren las mismas cantidades de un metal en particular. La cantidad que de estos elementos se tiene que añadir al medio de cultivo, depende de las impurezas que el mismo medio contenga como contaminantes.

En trabajos recientes se recomienda la adición de - - 10  $\mu$ g/ml de hierro, pero esto es una cantidad empírica. Los requerimientos de hierro para las Mycobacteria han sido establecidos por muchos trabajos: para M. phlei, la cantidad requerida -

para un desarrollo satisfactorio es de  $1 \mu\text{g/ml}$  (Turin, 1959) (22), para M. smegmatis y M. bovis es de  $2.0 \mu\text{g/ml}$  la adecuada (Winder y Denny) (22), para M. smegmatis concentraciones de  $1.0 \mu\text{g/ml}$  son requerimientos mínimos para su desarrollo.

El zinc se requiere en concentraciones de 0.2 y 0.4  $\mu\text{g/ml}$ , el manganeso se necesita en cantidades muy pequeñas, y algunos autores prefieren no añadirlo. Sin embargo, se ha visto que para el desarrollo de M. smegmatis se requiere  $2 \text{ ng Mn}^{2+}/\text{ml}$ .

Gonocharevskaya (22) encontró que  $0.12 \mu\text{g/ml}$  de  $\text{Mn}^{2+}$  estimulan el crecimiento de M. bovis BCG y que sin la adición de este metal el % en peso seco de las células disminuye de un 20 a 50%. Los requerimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  por especies de Mycobacteria fueron indicados por Edson y Hunter. Otras trazas de metales estudiados por sus características de promover el desarrollo bacteriano son:  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{BO}_3^{3+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^3$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{MoO}_4^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{VO}_3^-$ .

Ghys (22) hizo observaciones interesantes sobre la utilización de isótopos radioactivos en cepas de BCG, encontrando que todos los isótopos (Fe, Zn, Mn, Co, Sr, Cs, Pm, Eu, Hg y I) eran utilizados y cuando las concentraciones de Fe eran altas, la célula tenía una avidez por el Zn y que si se suministraban los iones requeridos, se alcanzaban concentraciones intracelulares tóxicas.

Un sumario de las consecuencias metabólicas por defi--

ciencia en trazas de metales en las Mycobacteria se muestra en la Tabla 1.

TABLA I

CONSECUENCIAS METABOLICAS POR DEFICIENCIA EN TRAZAS DE METALES.

<u>Elemento</u>	<u>Cantidad requerida( /ml)</u>	<u>Consecuencia de la deficiencia.</u>
S	0.4 mg (como sulfato)	Elongación de las células; decremento en las síntesis de DNA y proteínas.
Hg	1.0 mg	Ramificación de las células y ausencia de gránulos de polifosfato.
Fe	1.0 $\mu$ g	Elongación de las células; declinación de la síntesis de DNA.  Decremento en la actividad de enzimas que requieren - Fe.  Bajo contenido de citocromos y coproporfirinas.  Incremento de isoflavonoides.
Zn	0.4 $\mu$ g	Incremento de polifosfatos y niveles de ATP.  Decremento en la actividad de enzimas que requieren - Zn.
Mn	0.12 $\mu$ g 5.5 $\mu$ g	Rendimiento celular bajo. Decremento en la síntesis de micobactinas.

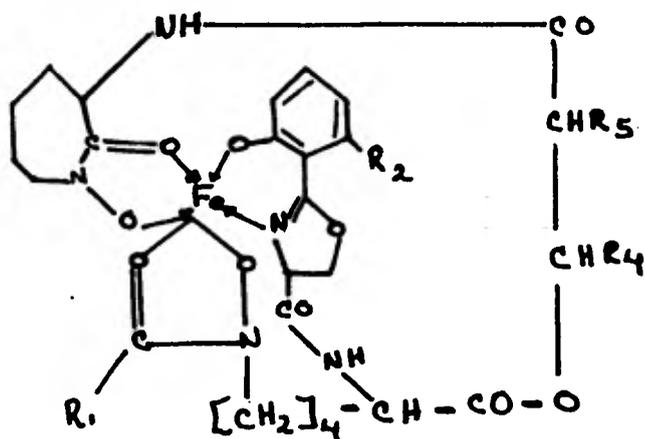
Tomada de: Bacteriological Reviews. 34; 99 - 125 (1970).

De todos los metales, el metabolismo del hierro y el del zinc han sido estudiados con detalle, debido a que estos -- elementos son indispensables para el desarrollo de las Mycobacteria y el elucidar cuál es el mecanismo o los puntos clave donde actúan, tiene mucha importancia en el desarrollo de agentes-- quimioterapéuticos.

3.4.- Asimilación y transporte de hierro. Las sales de Fe a -- pH fisiológico son insolubles y esto constituye un problema para todos los organismos, pero estos han desarrollado una gran -- variedad de iones quelantes resolviendo así el problema. Los -- quelatos son generalmente solubles en agua y se encuentran ex-- tracelularmente, son producidos en grandes cantidades cuando -- las concentraciones de Fe están limitando el desarrollo. El -- complejo ión-quelato es una forma mediante la cual el ión es -- transportado al interior de la célula. Sin embargo, en las Mycobacteria se han desarrollado otros mecanismos, debido tal vez a la gruesa capa lipídica de su envoltura celular.

El principal agente quelante en las Mycobacteria son las micobactinas, las cuales son solubles en materiales lipídicos y fueron originalmente aisladas de M. phlei y como un factor de crecimiento en M. paratuberculosis. Todas las especies de Mycobacteria producen micobactinas y la estructura química ha sido elucidada por Snow y col. (119).

La figura 3 muestra las estructuras de las micobacti-



<u>Microorganismo.</u>	<u>Micobactina aislada.</u>	$R_1$	<u>Sustituyentes.</u>			
			$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R_5$
<u>M. aureum.</u>	A	13	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H
<u>M. fortuitum.</u>	F	17,11	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
<u>M. termoresistible.</u>	H	19,17	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
<u>M. marinum.</u>	M	1	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>35</sub>	CH <sub>3</sub>
<u>M. marinum.</u>	N	2	H	CH <sub>3</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>35</sub>	CH <sub>3</sub>
<u>M. phlei.</u>	P	17 cis	CH <sub>3</sub>	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>
<u>M. terrae.</u>	R	19	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<u>M. smegmatis.</u>	S	17,15 cis	H	H	CH <sub>3</sub>	H
<u>M. tuberculosis.</u>	T	19	H	H	CH <sub>3</sub>	H

Fig. 3.- Estructura de la micobactina; las cadenas laterales son grupos alquílicos en  $R_1$  y tienen el número de átomos indicado, los dobles enlaces se indican cuando son conocidos.

Tomada de: Bacteriological Reviews, 39, Pág. 123. (1970).

nas; recientemente se han hecho estudios sobre la estructura de la ferrimicobactina P con cristalografía de rayos X (Hough y Rogers) (119). La molécula tiene gran estabilidad y actualmente se han realizado síntesis químicas de análogos de estas estructuras.

La incorporación de elementos como lisina y ácido salicílico a estas estructuras por las Mycobacteria, ha sido estudiada por Hudson, Bentley, Retledge y Hall (119).

La distribución de micobactinas parece estar restringida al género Mycobacterium, pero se han aislado estructuras semejantes en la familia Nocardia.

Las micobactinas actúan como receptores primarios para el Fe; de éste el tipo coloidal o insoluble no es aceptado por la micobactina (Retledge, 1974)<sup>22</sup>. El complejo de ferrimicobactina formado se mueve a través de la envoltura celular por la creación de un gradiente de concentración y después de que el Fe ha sido depositado en el interior, la micobactina atraviesa la pared celular nuevamente, debido a otro gradiente de concentración pero de sentido opuesto.

La afinidad de la micobactina por el  $Fe^{3+}$  es extremadamente alta (K de estabilidad  $10^{30}$ ), el Fe es liberado por un mecanismo específico constituido por una NAD reductasa que convierte el complejo  $Fe^{3+}$  -micobactina a  $Fe^{2+}$  -micobactina. (Retledge y Marshall, 1972)<sup>22</sup>.

El átomo de  $Fe^{2+}$  tiene muy poca o ninguna afinidad por

el quelato y es capaz de dejar libre a la molécula e insertarse en una porfirina como paso final.

La micobactina es extremadamente lipofílica y tiene -- muy poca solubilidad en agua. Como la micobactina no puede reaccionar con hierro insoluble o coloidal, la manera como el microorganismo solubiliza este Fe, es por medio del ácido salicílico, - el cual es producido en grandes cantidades durante una deficiencia de Fe en el medio de cultivo por M. smegmatis y M. tuberculosis.

En M. phlei se produce un análogo, el ácido 6 metil salicílico en las mismas condiciones de carencia de Fe. El ácido salicílico funciona como un quelante de iones de tipo extracelular, además el ácido salicílico no es metabolizado en ningún -- otro compuesto más que en micobactina. Existe la evidencia de -- que el ácido salicílico actúe sólo como catalizador y el -- verdadero quelante sea un compuesto bastante soluble en agua, de naturaleza oligopéptida que contiene  $\epsilon$  N- hidrolisina, alo-treona y alanina. Este compuesto recibe el nombre trivial de hidroquinoleína.

El mecanismo de transporte de Fe está dado en la figura 4. Brown en 1975, trabajó sobre este mecanismo en células -- que provenían de cultivos deficientes en Fe, y utilizando un exceso de los demás componentes. Sin embargo, este mecanismo también se observa en células presentes en medio de cultivo con re-

querimientos apropiados de Fe, por lo tanto existe, solo una --  
vía para la asimilación de Fe.

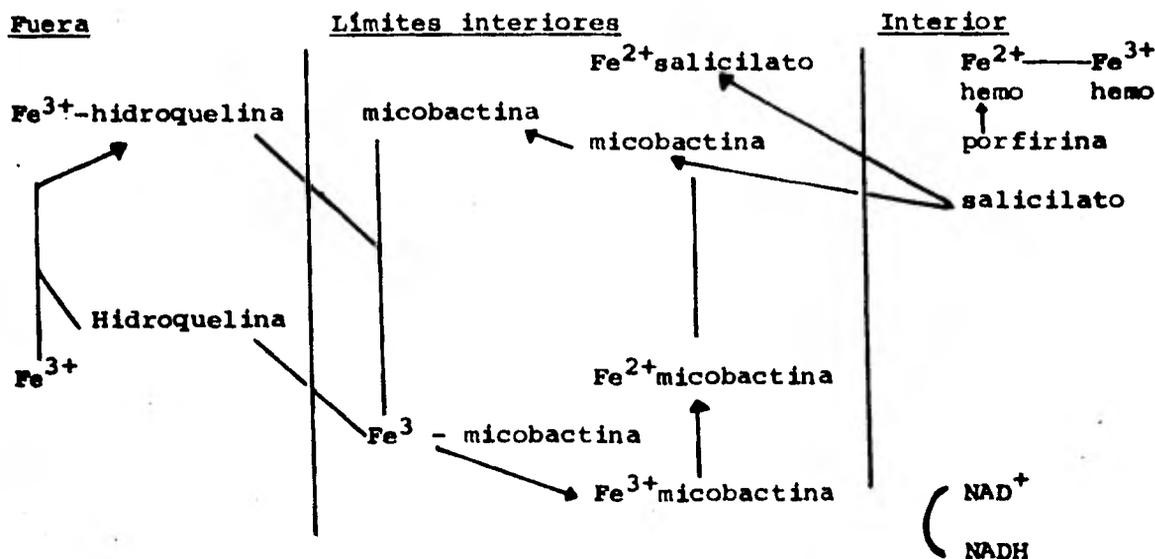


Fig. 4.- Hipótesis del transporte de Fe y su asimilación por Ratledge y Marshall (22).

3.5.- Desarrollo in vitro, Observaciones generales. La mayoría de las Mycobacteria desarrolla en medios químicos bien definidos; sin embargo, la velocidad de desarrollo puede variar, -- desde el crecimiento de M. tuberculosis, que es lento, hasta el de los saprófitos como el de M. phlei y M. smegmatis, que es relativamente rápido.

Si el desarrollo se efectúa sin agitación, todas las Mycobacteria desarrollan en forma de una membrana costrosa so--

bre medios líquidos, y el crecimiento máximo se alcanza entre 8- a 10 semanas para M. tuberculosis y 4 a 5 días para M. smegmatis. En un medio de cultivo con fuentes de carbono y nitrógeno adecuadas, el desarrollo de las Mycobacteria puede mejorarse con agitación, pero ésta debe ser lenta. Bowles y Segal (22) encontraron que con un agitador de 200 rpm/min se acorta la fase lag de M. tuberculosis de 40 días a 13. Sin embargo utilizando condiciones similares en el desarrollo de M. smegmatis no hubo ningún cambio.

La adición de surfactantes, como tween 80, a los medios de cultivo, tienden a incrementar el desarrollo debido a que previene la agregación de células; sin embargo, este incremento en el desarrollo no se compara al que se obtiene en medios de cultivo líquidos con agitación.

El tween 80 no es un surfactante de tipo pasivo y afecta el metabolismo de la célula, específicamente su composición. Stinson y Solotorovsky (22) encontraron que el tween 80 era efectivamente hidrolizado por cepas de M. avium y el ácido oléico resultante, incorporado a los lípidos.

Por otra parte el tween 80 en concentraciones aproximadas al 1% en los medios de cultivo, incrementa el volumen celular en un 45% y dobla el contenido total de lípidos.

Weir (22) mostró que el ácido oléico era incorporado a los triglicéridos o podía existir sin ningún cambio en el cito--

plasma en forma de glóbulos. En el desarrollo M. smegmatis bajo diferentes condiciones de agitación, se observa que la fase lag no se acorta; sin embargo, la velocidad de desarrollo se incrementa. Las razones para este incremento serían la dispersión de las células, que produce aumento en el % de peso seco y fijación de CO<sub>2</sub> por la continua aereación del medio de cultivo. La fijación de CO<sub>2</sub> por las Mycobacteria es importante en el metabolismo y puede contribuir apreciablemente al contenido total de carbono. (Wherry y Ervin)<sup>22</sup>.

David J. Dawson y Frank Jennis (40) aislaron una Mycobacteria que requería para su desarrollo de citrato de amonio férrico, esta Mycobacteria había sido identificada por Sompolinsky<sup>122</sup> en 1978 quien propuso el nombre de M. haemophilum. Su aislamiento se realizó a partir de un granuloma subcutáneo de un paciente que había recibido un tratamiento inmunosupresor debido a la enfermedad de Hogkin; esta cepa tenía requerimientos especiales para su desarrollo, como hemina o hemoglobina.

Dawson y Jennis (40) cultivaron diferentes cepas de M. haemophilum sobre varios medios de cultivo, y a diferentes temperaturas, obteniendo los siguientes resultados; en Lowenstein Jensen el desarrollo aparece a los 8 ó 10 días, sobre Lowenstein Jensen con 15 mg de citrato de amonio férrico, el desarrollo es más abundante, lo mismo que en gelosa sangre (sangre de carnero). Las cepas desarrollan bien sobre Middlebrook 7H9 conteniendo hemina o citrato de amonio férrico, en aproximadamente 10 días. -

En gelosa chocolate y Middlebrook 7H10 con hemina, el desarrollo aparece lentamente. En lo referente a temperaturas, las cepas -- crecen satisfactoriamente a 32°C, pero más lentamente a 36°C.

C. Thoen y Elmer Himes (135) compararon la eficiencia de 4 medios de cultivo para el aislamiento de M. avium que es -- considerado el agente etiológico más común de la peste de los -- cerdos, conocida como tuberculosis de los cerdos en los Estados- Unidos. Se estudiaron 197 nódulos linfáticos de tejidos porci-- nos, de los cuales 82 mostraron granulomas microscópicos con bacilos ácido-alcohol resistentes, un número significativo de cepas de M. avium fueron aisladas en Middlebrook 7H10 con piruvato de sodio. El tiempo requerido para el desarrollo de M. avium sobre Lowenstein-Jensen es significativamente mayor que el tiempo re-- querido para observar desarrollo sobre Middlebrook 7 H10, Agar - de huevo de Herrold o Stonebrink. (Laboratorios Difco).

Morimoto, Rothrock y Stottmeier (87) realizaron inves-- tigaciones en 204 especímenes clínicos de diferentes orígenes co-- mo esputo, orina y líquido cerebroespinal, para determinar la -- forma más adecuada de aislamiento de Mycobacteria. Utilizaron -- medios como Lowenstein - Jensen y Middlebrook 7H9. Los especíme-- nes sembrados sobre Lowenstein-Jensen se trataron previamente con NaOH al 2% y los especímenes sembrados en Middlebrook 7H0, se re-- sembraron a los 20 días en Lowenstein - Jensen, incubándose en at-- mósfera de CO<sub>2</sub> a temperaturas de 35 a 37°C por otros 20 días.

Los resultados de los aislamientos se muestran en la Tabla 2.

Los autores concluyen que el medio de Middlebrook -- 7H9 no ofrece ninguna ventaja sobre el medio Lowenstein-Jensen incubando en CO<sub>2</sub>, para el aislamiento de microorganismos ácido alcohol resistentes.

Hobby y col. (87) encontraron que se requería de una incubación previa de 8 semanas para el aislamiento de M. tuberculosis de lesiones pulmonares, sobre medios líquidos con albúmina o con tween 80 y albúmina.

La dificultad para el aislamiento de microorganismos a partir de nódulos linfáticos fue descrita por Wilmont (87), -- más del 80% de nódulos linfáticos, histológicamente positivos -- a bacilos ácido - alcohol resistentes, provenientes de animales infectados, no dieron desarrollo sobre medios habituales de -- cultivo. Se supone la presencia de una sustancia de tipo bacteriostática en los nódulos de los animales infectados.

Carson, Petersen, Favero y Agüero (17) compararon la resistencia a los desinfectantes y la capacidad de desarrollo de diferentes cepas de Mycobacteria aisladas de fluidos peritoneales y máquinas de diálisis peritoneal, específicamente M. chelonae (cepas Tm), que son capaces de desarrollarse en agua destilada comercial, con tiempos de generación a 25°C, de 8 a 15 horas.

TABLA 2

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS ACIDO-ALCOHOL RESISTENTES DE TE-  
JIDOS Y ESPECIMENES FLUIDOS

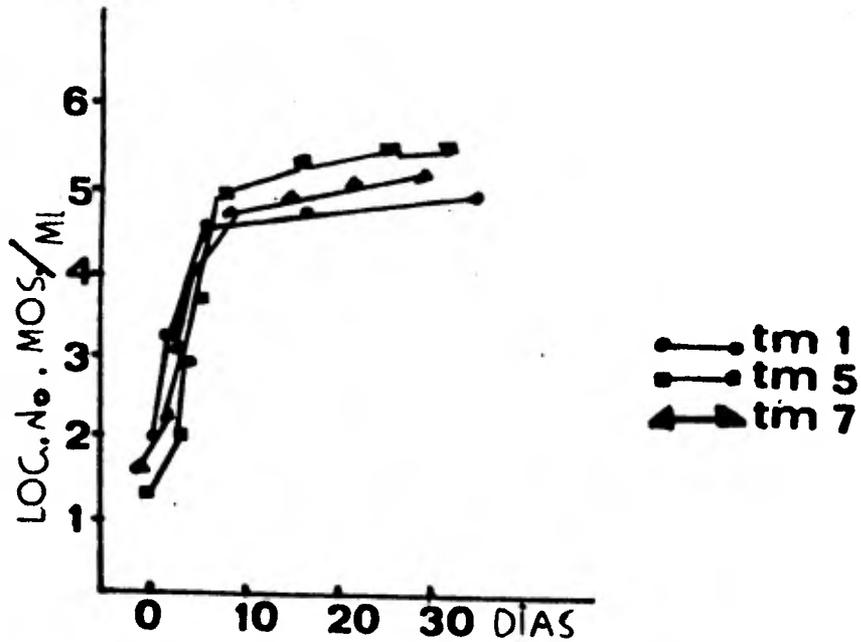
<u>No. y tipo de especimen.</u>	<u>M. tuberculosis.</u>		<u>* Otras Mycobacteria.</u>	
	<u>7H9</u>	<u>7H9, L-J o ambos.</u>	<u>7H9</u>	<u>L-J o ambos.</u>
56 Pulmón.	4	34	16 <u>M. intracellulare.</u>	2 <u>Nocardia asteroides.</u>
56 Líquido pleural.	5	46	2 <u>M. intracellulare.</u>	1 <u>M. scrofulaceum.</u>
			1 <u>M. gordonae.</u>	1 <u>M. vaccae.</u>
38 Nódulos linfáticos cervicales.	1	32	5 <u>M. intracellulare.</u>	
12 Abscesos de piel.	0	6	2 <u>M. intracellulare.</u>	2 <u>M. marinum.</u>
			1 <u>M. bovis.</u>	1 <u>M. bovis BCG.</u>
10 Líquido sinovial.	1	9	0	
10 Hueso.	2	7	1 <u>M. gordonae.</u>	
8 Genitales.	1	7	0	
5 Médula ósea.	1	4	0	
3 Hígado/riñón.	0	3	0	
3 Tracto gastro-in- testinal y epiglo- tis.	0	3	0	

Tomada del Journal of Clinical Microbiology. Oct. 1979, pág. -

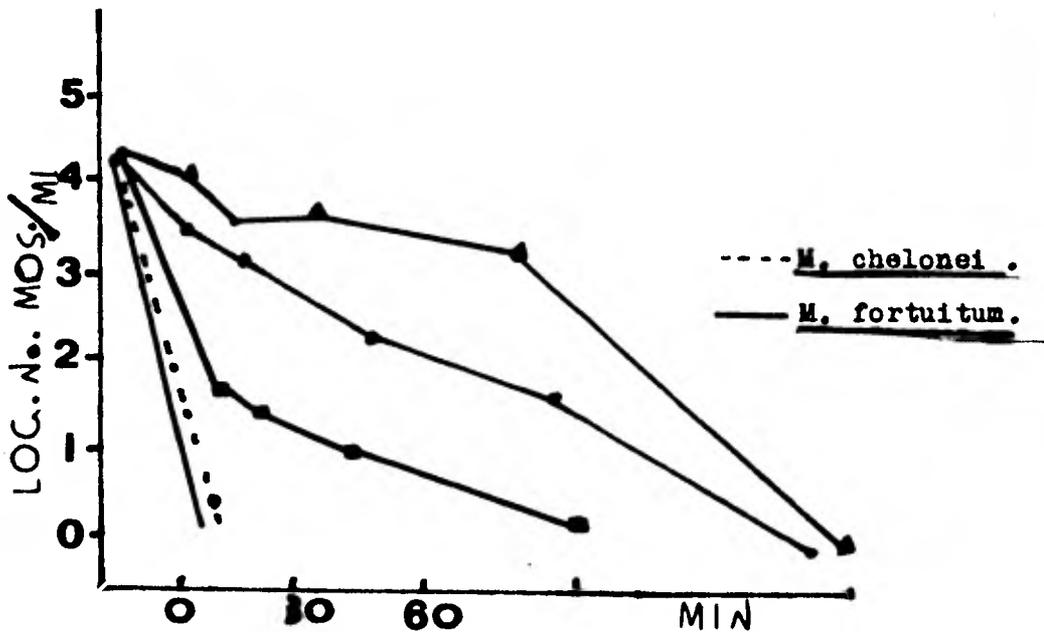
Se han obtenido niveles de  $10^5$  a  $10^6$  células por ml - de agua y la fase estacionaria de la población declina levemente después de un período de un año. Los resultados de los estudios para determinar la resistencia de las Mycobacteria a los desinfectantes se muestran en las figuras 5 a la 10. Los desinfectantes utilizados en el estudio son los comúnmente empleados en la descontaminación de equipo hospitalario. Las bacterias - como M. chelonae cultivadas en agua comercial, muestran sobrevivencia en solución acuosa de HCHO al 2% hasta las 24 horas; en una solución acuosa al 8% de HCHO hay una reducción de 2 unidades logarítmicas de las células viables a las 2 horas de tomada la muestra. Comparando con cepas tipo ATTC de M. chelonae y -- M. fortuitum, se ve que estas últimas son rápidamente inactivadas a las 2 horas de exposición a una solución acuosa al 2% de HCHO y a 15 min en una solución al 8% de HCHO.

En relación con el glutaraldehído alcalino al 2%, las cepas Tm resisten hasta por 60 minutos, en comparación con las cepas tipo ATTC que no sobreviven después de unos minutos, en comparación con las cepas tipo ATTC que no sobreviven después de unos minutos de contacto con el desinfectante. Todas las cepas de M. chelonae y M. fortuitum resisten 60 minutos después de la exposición a 0.3 y 0.7  $\mu$ g de cloro libre por ml a pH 7.

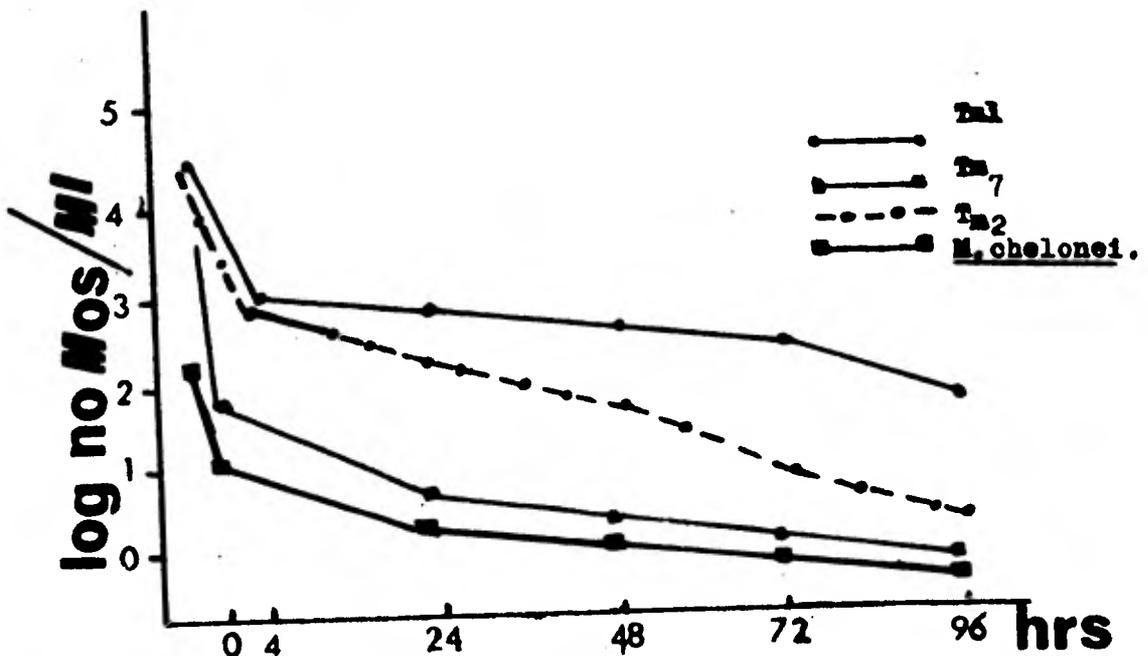
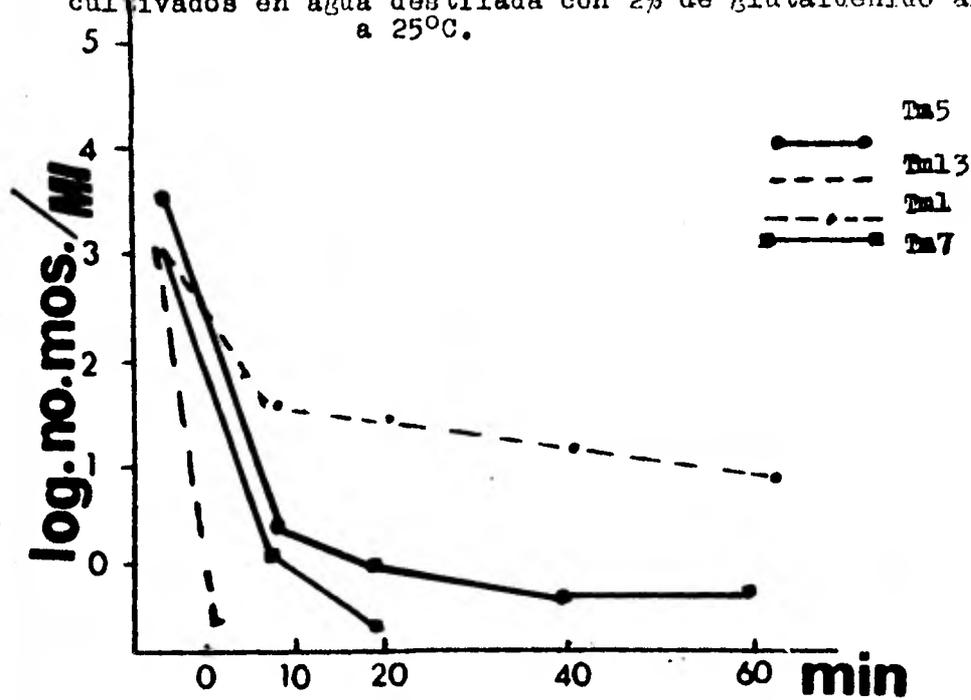
5.- Desarrollo comparativo de M. chelonei en agua destilada a 25°C.



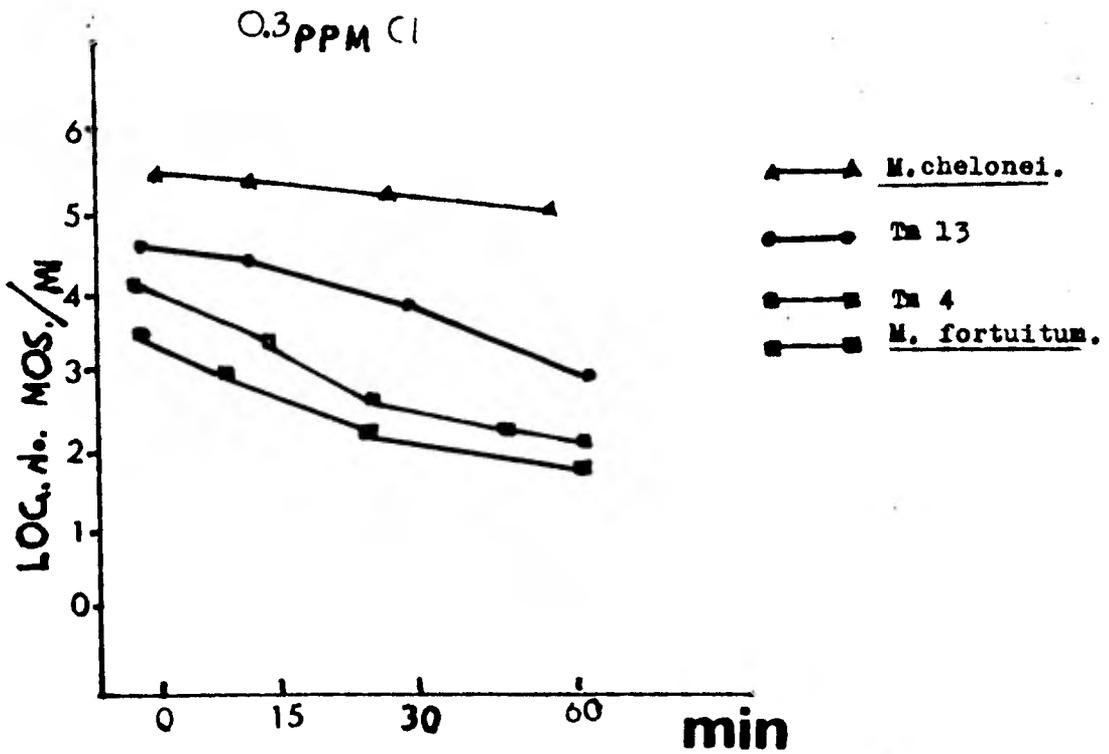
6.- Resistencia comparativa de microorganismos Tm cultivados en agua destilada y expuestos a formaldehído al 8%.



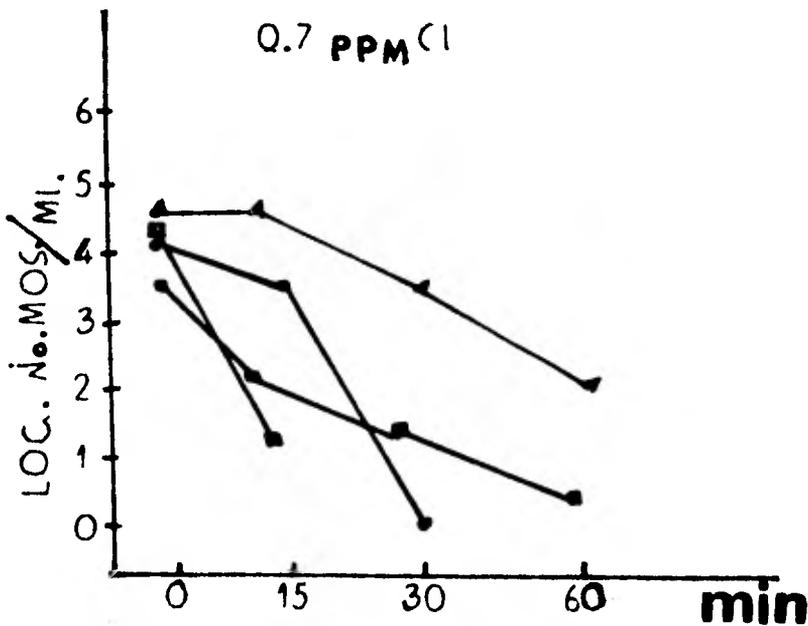
7.- Resistencia comparativa de microorganismos micobacterianos cultivados en agua destilada con 2% de glutaldehido alcalino a 25°C.



8.- Resistencia comparativa de microorganismos micobacterianos - cultivados en agua destilada con 0.2% de glutaraldehido alcalino a 25°C.



9 y 10.- Resistencia comparativa de microorganismos micobacterianos cultivados en agua destilada con 0.3 y 0.7 mg de cloro libre por ml a pH  $\approx$  7.



#### 4.- Diagnóstico bacteriológico de las Micobacteriosis.

El diagnóstico bacteriológico específico de una micobacteriosis, debe realizarse en tres pasos principalmente:

a.- Demostración de bacilos ácido-alcohol resistentes en las secreciones patológicas de tejidos.

b.- Aislamiento del agente causal en forma pura.

c.- Identificación del microorganismo mediante pruebas bioquímicas y serotipificación.

4.1.- Tipos de especímenes y métodos de descontaminación y concentración. Las Mycobacteria pueden ser aisladas de una gran variedad de especímenes clínicos que incluyen esputo, orina, líquido cefalorraquídeo, biopsias de tejidos como hígado, médula ósea y nódulos linfáticos o de cualquier otra fuente donde se sospeche que exista un foco de infección tuberculosa.

Los especímenes que contienen flora mixta deben ser procesados para reducir el problema de contaminación. El alto contenido de lípidos en las paredes celulares de las Mycobacteria determina su resistencia a ácidos fuertes y soluciones alcalinas. El tiempo de exposición del espécimen a agentes descontaminantes fuertes como el NaOH al 4%, ácido oxálico al 5%, debe ser cuidadosamente vigilado para evitar un excesivo daño químico.

El uso de trifosfato de sodio combinado con cloruro de benzalconio ( Zephiran ) es un método muy utilizado en muchos -

laboratorios. Los especímenes que contienen gran cantidad de ba cilos tuberculosos soportan bien una sobreexposición de estos -- agentes y por lo tanto no es necesario controlar el tiempo, sin- embargo los especímenes tratados con Zephiran deben ser inocula- dos a un medio de cultivo que contenga huevo para neutralizar la inhibición del desarrollo bacteriano causada por el Zephiran.

El método de N- acetil L- cisteína con NaOH permite la- licuación del moco del esputo, mediante el uso de NaCl que es un- agente mucolítico, sin actividad antibacteriana, pero que reduce- los enlaces disulfuro, logrando así liberar a las Mycobacteria y- que puedan ser efectivamente concentradas por centrifugación. El NaOH al 2% en la solución sirve como agente descontaminante. De- bido a la alta fuerza iónica de estas soluciones el punto neutro- es difícil de alcanzar, pero el uso de solución amortiguadora de- fosfatos en grandes cantidades, permite el lavado del espécimen y la dilución de sustancias tóxicas y, además disminuye la viscosidad del espécimen y la centrifugación es más efectiva, concentrando - mayor número de bacilos.

El NaOH al 4% es el descontaminante común utilizado por la mayoría de los laboratorios. El NaOH al 4% realiza una acción mucolítica efectiva y la concentración se logra por centrifuga- - ción.

El cloruro de cetilpiridinio al 1% con NaCl al 2% es un efectivo agente descontaminante utilizado para especímenes de es- puto que tienen que transportarse. El bacilo tuberculoso sobrevi

ve hasta por 8 días sin pérdida significativa de su viabilidad.

Los procedimientos de tinción y descontaminación de es pecímenes se encuentran discutidos en el Apéndice B.

#### 4.2.- Medios de cultivo.

Medio de Lowenstein-Jensen. Agregando huevo al medio-base de Lowenstein-Jensen se prepara este medio para cultivar - - Mycobacteria especialmente M. tuberculosis. Lowestein usó un me dio con rojo congo o verde de malaquita para inhibir parcialmen- te el desarrollo bacteriano. Otros investigadores emplearon de- modo semejante estos colorantes, principalmente Sonnenschein y - Hohn (103). En los Estados Unidos eran populares los medios con violeta de genciana de Corper y de Petroff, y más recientemente- lo fue el medio de Petraghani, que contiene verde de malaquita.

En la fórmula actual desarrollada por Jensen, el citra to y fosfato están en concentración algo diferente; pero el colo rante y la cantidad son iguales al de Lowenstein, esto es, de con tenido menor al que generalmente se emplea en el medio de Petrag nani. Por lo tanto, el medio o la fórmula de Jensen puede poseer una capacidad inhibitoria menor que el medio de Petraghani, y -- acusar una proporción mayor de resultados positivos a partir de- materiales con Mycobacteria.

También se puede anticipar un mayor porcentaje de con- taminantes, aunque Cumming, en 7362 especímenes informó menor nú mero de contaminantes y mayor de positivas (103).

Hughes y col. (103) informaron que el medio L-J es el mejor para los diagnósticos corrientes, y obtuvieron más cultivos positivos por cultivo que por análisis de frotis.

Se han hecho innumerables estudios comparativos después del de Cummings. Algunos más recientes confirman la superioridad del medio L-J, como por ejemplo los de Gutiérrez - Vázquez (103) que lo compararon con el agar de sangre y penicilina, y con el agar de carbón de Hirsh y los de Berte y Turker (103)- quienes probaron el L-J en paralelo con un medio RDM-1 de albúmina y ácido oléico modificado. Además de las Mycobacteria, la Nocardia también desarrolla en el medio L-J y se le puede aislar de esputos, lavados gástricos, y de otros especímenes (Para fórmula y preparación consultar Apéndice A).

Agar de Middlebrook y Cohn 7H10. El agar de Middlebrook y Cohn 7H10 es un medio con una fórmula mejorada del agar de ácido oléico - albúmina. Se usa para el aislamiento y pruebas de sensibilidad de Mycobacteria, favoreciendo el desarrollo temprano de bacilos tuberculosos típicos. Los autores obtuvieron 83 positivas en agar 7H10 y 82 positivas en el medio de Lowenstein-Jensen en un estudio de 100 especímenes de pacientes, - el volumen del desarrollo fue mucho mayor en el agar 7H10, después de incubar durante tres semanas. (Para fórmula y preparación consultar el Apéndice A).

Agar inclinado 7H11. El agar 7H11 es el agar 7H10 de Middlebrook y Cohn modificado por la adición de un gramo de hi-

drolizado enzimático de caseína (peptona tripticase) por litro.

Se usa para el cultivo y para las pruebas de sensibilidad de Mycobacteria, especialmente de aquéllas que desarrollan pobremente en el agar 7H10 y en otros medios comunes de aislamiento (Para fórmula y preparación consultar el Apéndice A).

Caldo de Middlebrook 7H9. El caldo de Middlebrook -- 7H9 enriquecido con albúmina y dextrosa o con otros materiales, puede usarse en procedimientos que comprenden el desarrollo de Mycobacteria, incluso de M. tuberculosis.

Con la adición de enriquecimiento de ADC de Middlebrook (Albúmina oléica), y 25,000 unidades de penicilina, este caldo puede usarse para el ensayo del contenido de INH en sueros de pacientes, en el proceso recomendado por el Laboratorio de Diagnóstico de Tuberculosis del Hospital de Veteranos de las Fuerzas Armadas, Washington (103) (Para fórmula y preparación consultar el Apéndice A).

Medio de Petraghani. El medio de Petraghani es un medio glicerolado de huevo y papa, elaborado con una base de leche y verde de malaquita en una concentración de 0.045%. Algo más inhibitorio que el L-J, debido a su contenido más elevado de colorante, el medio de Petraghani se recomienda para especímenes viejos y para usarse paralelamente con otros medios para aislamiento de bacilos tuberculosos.

Medio de Petroff. Es un medio glicerolado de huevo -

coagulado con una base de infusión de res, que contienen cristal violeta como agente inhibidor selectivo. En rendimiento es similar al medio de Petraghani, o tal vez ligeramente menos inhibitorio.

Agar Inclinado Mycobactosel. El agar para selección de Mycobacteria es el agar 7H11 más cicloheximida, lincomicina - ácido nalidixico, para la inhibición de los microorganismos contaminantes y para permitir la obtención de resultados negativos y positivos más confiables, en el aislamiento de especímenes de flora mixta (Para fórmula y preparación consultar Apéndice A).

Agar con ácido oléico de Dubos. La base con ácido oléico de Dubos se emplea para la preparación de varios medios translúcidos, incluyendo el agar con ácido oléico y el agar con tween y albúmina, que son en especial útiles para el estudio de la morfología y disociación de las colonias, así como para el re cuenta bacteriano por el número de colonias. También se puede emplear la preparación de cultivos masivos de cepas que se mantienen siempre en existencia en el laboratorio, en las pruebas de sensibilidad de los cultivos frente a los agentes antibacterianos y en el aislamiento de los bacilos tuberculosos.

Para algunos propósitos, no es necesario añadir enriquecimiento, puede usarse suero, tween 80, o ambos.

La base de agar por sí sola es capaz de producir desarrollo de la mayoría de los cultivos puros de las Mycobacteria.-

(Para fórmula y preparación consultar el Apéndice A).

4.3.- Pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación de las Mycobacteria. Los procedimientos usados ó propuestos por varios investigadores (36) para la identificación de las Mycobacteria son muy numerosos. A continuación se dan algunos de los más conocidos:

Actividad de peptidasa con un sustrato cromogénico.  
 Transformación de sales férricas.  
 Acumulación de hierro en las células.  
 Tolerancia a ácido pícrico.  
 Actividad de amidasa.  
 Inhibición del desarrollo por 8 hidroxiquinolina.  
 Movilidad electroforética de catalasas y estererasas.  
 Estructura específica de micósidos de diferentes especies.  
 Cromatografía de lípidos en capa fina.  
 Cromatografía gas-líquido (pirólisis).  
 Susceptibilidad a colorantes.  
 Actividad de ureasa.  
 Actividad de pirazinamidasas.  
 Hemólisis de eritrocitos de cuy.  
 Actividad de fosfatasa ácida.  
 Actividad de formamidasas.  
 Actividad de glucosidasas.  
 Actividad de nitrato reductasa en presencia de ácidos grasos y compuestos relacionados.  
 Prueba de niacina.  
 Prueba de catalasa.  
 Actividad de nitrato reductasa.  
 Actividad de arilsulfatasa.  
 Hidrólisis de tween 80.  
 Reducción de telurito.

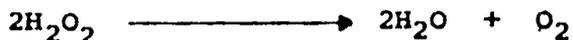
Las seis últimas pruebas son las más comunmente utilizadas en el laboratorio para el diagnóstico de una micobacteriosis.

Prueba de niacina. La niacina es formada en el metabolismo de las Mycobacteria, pero la mayoría de las especies poseen una enzima que convierte la niacina libre en ribonucleato de niacina. M. tuberculosis, M. simiae y cepas de M. marinum y M. chelonae, así como un número importante de cepas de M. bovis carecen de la enzima y pueden acumular la niacina libre como un producto soluble en agua y que es excretado al medio de cultivo. La cantidad de niacina acumulada refleja directamente la edad del cultivo.

Fundamento de la prueba de niacina. En la prueba química descrita por Runyon, el ácido nicotínico reacciona con el bromuro de cianógeno en presencia de un amina primaria (anilina) para formar un compuesto de color amarillo (36,74).

Prueba de catalasa. La mayoría de las Mycobacteria produce catalasa, pero varían en la cantidad producida. Algunas formas de catalasa son inactivadas a 68°C por 20 minutos y otras son estables. La semicuantificación de catalasa y la susceptibilidad al calentamiento a 68°C a pH 7.0 son 2 características útiles para la identificación de Mycobacteria.

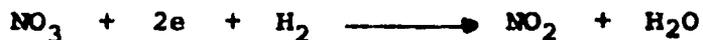
Fundamento de la prueba de catalasa. Los microorganismos productores de catalasa tienen la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre.



La prueba para la determinación de catalasa micobacteriana difiere de las pruebas usadas para la detección de catalasa en el uso de peróxido de hidrógeno al 30% (Superoxol) (37) con una solución de un tensoactivo como el tween 80 en lugar de peróxido de hidrógeno al 3%. El detergente o tensoactivo ayuda a la dispersión de las colonias bacterianas, con el fin de optimizar la prueba (74).

Prueba de nitrato reductasa. La presencia de la enzima nitrato-reductasa es una importante característica para la identificación de M. tuberculosis, M. kansasii, M. szulgai, y M. fortuitum todos ellos reducen el nitrato a nitrito, otras especies que también son positivas para esta prueba son: M. flavescens, M. terrae, M. triviale y M. chelonae.

Fundamento de la prueba de nitrato reductasa. Las Mycobacteria que contienen nitrato reductasa pueden producir oxígeno de los nitratos. La reacción química es la siguiente:



La presencia de nitrito se detecta por la adición de sulfanilamida y n-naftiletildiamina en pH ácido, al medio de cultivo de prueba, si el nitrito está presente se forma una coloración roja debido a un colorante diazoico (74).

Prueba de arilsulfatasa. La arilsulfatasa es una enzima secreta da por ciertas Mycobacteria. Los miembros del cómpleso M. fortuitum-chelonei son los únicos que producen suficiente enzima para producir pruebas positivas en tres días. Cantidades pequeñas son producidas por M. xenopi, M. szulgai, M. marinum, M. kansasii, M. gordonae y algunos miembros del cómpleso M. avium-intracellulare. La prueba no es de utilidad para identificar estas especies únicamente el cómpleso M. fortuitum-chelonei.

Fundamento de la prueba de arilsulfatasa. La arilsulfatasa es una enzima que libera a la fenoftaleina de la sal disulfato tripotásico de fenoftaleina, el carbonato de sodio alcaliniza el medio y la fenoftaleina forma una sal disódica que produce un color rosa (74).

Prueba de hidrólisis de tween 80. La cepa que no tienen importancia clínica generalmente son positivas para esta prueba, como son: M. gastri, M. terrae y M. triviale. Las cepas como M. scrofulaceum y el cómpleso M. avium-intracellulare son negativos para esta prueba.

Fundamento de la prueba de hidrólisis de tween 80. Tween 80 es el nombre trivial del detergente monooleato de polioxietilen sorbitan y ciertas Mycobacteria poseen una lipasa capaz de hidrolizar el tween 80 en ácido oléico y sorbitol polioxoetilado, el cual modifica las características ópticas de la solución de prueba.

ba de un color amarillo, producido por el paso de la luz a través de la solución intacta de tween 80, a un color rosa. El -- cambio en la coloración no indica un cambio en el pH debido a -- que el ácido oléico es neutralizado por la solución amortiguado -- ra de fosfatos. La modificación en la coloración indica la des -- trucción del tween 80 (74).

Prueba de reducción de telurito. Esta prueba es importante para diferenciar entre las Mycobacteria en general y las Mycobacteria de desarrollo lento no cromogénicas (Grupo III de Runyon).

Fundamento de la prueba de reducción de telurito. Las células-micobacterianas reducen las sales de la telurito en telurito me -- tálico. El telurito actúa como un aceptor artificial de electro -- nes y se reduce a telurito metálico de color negro, este proce -- so es realizado por la telurito reductasa que se encuentra en -- forma soluble en M. avium (36).

Los procedimientos de las pruebas bioquímicas están -- descritos en el Apéndice C.

##### 5.- Pruebas de susceptibilidad a drogas.

En la mayoría de los pacientes con tuberculosis, el -- tratamiento incluye a dos o más de las drogas utilizadas en for -- ma primaria para la tuberculosis: isoniácida, estreptomycin, -- ácido para-amino salicílico, etambutol y rifampicina. Sin em--

bargo, es necesario probar la susceptibilidad de los bacilos aislados del paciente frente a estas drogas. Generalmente no es necesario esperar los resultados de estas pruebas para instituir una terapia inicial. Cuando el paciente ha recibido una quimioterapia antituberculosa, es importante determinar el patrón de susceptibilidad a la droga, ya que en los casos de retratamiento, es común observar en los microorganismos resistencia a la droga. En ambos casos, cuando el tratamiento no produce resultados negativos en el esputo del paciente en pocos meses, existe la posibilidad de que estén apareciendo microorganismos resistentes y las pruebas de susceptibilidad tienen que ser repetidas.

Los métodos convencionales de difusión, en los cuales la susceptibilidad bacteriana de una droga dada es estimada en términos de una zona de inhibición alrededor de un disco, no son apropiados para las Mycobacteria, debido a su lento desarrollo.

Los métodos generales más aceptados para las pruebas de susceptibilidad son las basadas en el desarrollo o ausencia de éste sobre medios sólidos que contengan la droga a probar.

La composición del medio debe ser tal, que produzca la mínima desactivación de la droga; los medios 7H10, 7H11, Lowenstein-Jensen o cualquier otro que contenga huevo, elimina la posibilidad de enlace de la droga a moléculas orgánicas grandes, con

tenidas en el medio. Las drogas varían su estabilidad, y el medio que contiene la droga puede cambiar su potencia debido a alteraciones bruscas en el pH, temperatura, almacenamiento prolongado o desecación. Los medios deben almacenarse en refrigerador protegidos de la luz y por períodos no mayores de 4 semanas después de su preparación. Una vez establecido el medio de cultivo y la droga, es necesario correr en cada prueba un testigo para demostrar la actividad de la droga en el medio. La cepa de M. tuberculosis H37Rv es satisfactoria para estos propósitos.

La susceptibilidad de la droga resulta de la comparación entre el desarrollo obtenido en un medio de control y el obtenido en el medio que contiene la droga. El inóculo en cada cultivo debe ser uniforme; esto puede observarse por el desarrollo en 2 tubos de control sembrados con diferentes diluciones del inóculo.

La homogenización del inóculo y el evitar grandes cantidades de material grumoso, son cuidados necesarios. El inóculo debe ser abundante para producir el desarrollo de cuando menos 100 colonias en el medio de cultivo de control; esto resulta adecuado para tener datos estadísticos significativos (107).

El inóculo no debe ser tan abundante, que produzca colonias confluentes que cubran gran parte del medio en los tubos de control, en estos casos una pequeña proporción de bacilos resistentes a la droga ( 1% ) pueden aparecer en presencia de un -

gran número de colonias en el medio de cultivo que contiene la droga, sugiriendo una mayor resistencia de la que realmente existe. Es útil emplear un inóculo que permita la expresión de la resistencia en un rango menor de 1% o mayor del 1%.

Runyon, Karlson y Kubica (107) han demostrado que poblaciones resistentes a la droga mayores del 1%, provocan que el tratamiento ya no sea útil. Este 1% de bacilos resistentes comienza a ser la población predominante hasta llegar al 100%. Una población nativa de bacilos tiene un porcentaje menor del 1% de microorganismos resistentes y este porcentaje no provoca el fracaso del tratamiento.

Si el inóculo es preparado con un cultivo con un desarrollo discreto, la muestra debe ser representativa y deben tomarse de todos los tipos de colonias. Una gran proporción de pacientes, cuya población de bacilos muestran colonias pequeñas debido a un lento desarrollo, tienen más resistencia a las drogas (107, 151).

Una modificación de la proporción de bacterias resistentes, puede ocurrir por subcultivos in vitro; debido a esto se han desarrollado pruebas de susceptibilidad directa, esto es, con el espécimen tratado del paciente, siempre y cuando muestre en un frotis la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes. Sin embargo, estas pruebas directas pueden ser no satisfactorias debido a la contaminación o ausencia de desarrollo.

Consecuencias serias pueden resultar de un reporte fal

so de susceptibilidad a las drogas, que puede conducir a la sustitución de una droga primaria por una secundaria, que involucra más incomodidad y daño para el paciente debido a su toxicidad.

Los procedimientos para realizar las pruebas de susceptibilidad a las drogas se encuentran descritos en el Apéndice D.

## CAPITULO II

### METODOS DE CLASIFICACION DE LAS MYCOBACTERIA

A lo largo del siglo XX, han sido numerosos los intentos y fracasos de clasificar el género Mycobacterium. Quizás la primera clasificación, sea probablemente la de Hauduroy, que realizó un inventario de bacilos ácido-alcohol resistentes, no tuberculosos, que recogía 160 descripciones.

Penso y cols. (54) habían ensayado reagrupar las diferentes especies de Mycobacteria, proponiendo una clasificación del género Mycobacterium sobre la base de los seis caracteres siguientes:

Presencia y color del pigmento.

Temperatura óptima de cultivo.

Estudio de diversos factores de crecimiento.

Utilización de hidratos de carbono.

Sensibilidad a dosis diferentes de PAS.

Determinación de la sensibilidad a los bacteriófagos.

Esta clasificación debido a su complejidad, no ha tenido aplicaciones prácticas.

1.- Clasificación de Runyon. En 1959, Runyon reagrupa los diferentes casos de infecciones humanas y propone una clasificación del género Mycobacterium. Distingue cuatro grupos -- Mycobacteria que llama atípicas o anónimas: Grupo 1 fotocromóge

nas, Grupo II escotocromógenas, Grupo III no cromógenas y Grupo IV de crecimiento rápido (54).

La clasificación de Runyon, establecida sobre criterios frecuentemente subjetivos, a veces incostantes o variables, no responde a las exigencias de la taxonomía internacional. No obstante, tiene el mérito de ser la primera clasificación simple y suficientemente exacta, que ha canalizado las investigaciones biológicas de estos últimos años.

Devulver, Tacquet, Tison (54) Reconocen las imperfecciones de la clasificación de Runyon, basada sobre criterios - demasiado subjetivos, y estiman que debe sustituirse esta concepción equívoca de un agrupamiento artificial de Mycobacteria mal definidas, por la noción de especie micobacteriana perfectamente definida, bien sean patógenas o saprófitas.

2.- Clasificaciones Adansonianas.- Bojalil, Cerbón y Trujillo: en 1962 elaboran una clasificación adansoniana de las Mycobacteria, sobre la base de 25 caracteres.

En 1974, Wayne, Runyon y Kubica sobre la base de la clasificación de Runyon proponen el nombre de las Mycobacteria más frecuentemente aisladas y señalan las denominaciones ó sinónimos que deben abandonarse (16). (Ver Tabla 6).

Tsukamura divide el género Mycobacterium, en dos subgéneros Mycobacterium subgénero Mycobacterium (Mycobacteria de

crecimiento lento) y *Mycobacterium* subgénero *Mycomycobacterium* (*Mycobacteria* de crecimiento rápido) (136).

Tsukamura, Mizuno y S. Tsukamura en 1969 (54, 136) - realizaron un estudio numérico taxonómico para la *Mycobacteria* de crecimiento lento.

El propósito de este estudio fue la taxonomía del -- grupo *M. avium*, así como el de especies recientemente descri-- tas como *M. novum*, *M. terrae* (*M. nonchromogenicum*), *M. gastris* - y *M. thermoresistibile*.

Se probaron cerca de 94 características tales como: morfología colonial en agar de Sauton o medio con huevo, pig-- mentación, nitrato reductasa, arilsulfatasa, degradación de sa-- licilatos, desarrollo en medio de Ogawa conteniendo p- aminos-- licilato (medio de PAS), desarrollo en agar de Sauton conte-- niendo ácido pícrico, desarrollo a diferentes temperaturas acq-- tamidasa, benzamidasa, isonicotinamidasa, ureasa, pirazinamida-- sa, salicilamidasa, utilización de ácidos orgánicos como única fuente de carbono en presencia de nitrógeno como amoníaco, fer-- mentación de carbohidratos, glucosa, manosa, xilosa, tretrahaí-- losa, manitol con producción de ácido.

De este estudio se concluye que *M. avium* no es un -- grupo compacto y que existen varias especies denominadas se--- ries, por el Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana, -

las series están compuestas de las siguientes especies: M. avium, M. gastri, M. terrae, M. scrofulaceum, M. intracellulare.

En 1977, García - Sabater, Amador - Yscla y Perales Obenich (54) realizaron un ensayo de clasificación e identificación del género *Mycobacterium*, sobre la base de características bioquímicas y de cultivo. Estas dividen al género *Mycobacterium* en tres subgéneros: *MonoMycobacterium* (*Mycobacteria* típicas), *ByMycobacterium* (*Mycobacteria* de desarrollo lento) y *PolyMycobacterium* (*Mycobacteria* de desarrollo rápido). Todas las especies pertenecientes a cada uno de los subgéneros tiene una ó varias características en común: así el subgénero *MonoMycobacterium*, -- formado por M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum y M. ulcerans, tienen en común la ausencia de crecimiento en Sauton - agar y en el medio al Salicilato, así como no crecer a 28° C, -- además, son *Mycobacteria* patógenas siempre que se aíslan de -- productos patológicos.

Las especies que forman el género *BycoMycobacterium* -- tienen en común que desarrollan en agar de Sauton y en el medio al Salicilato, así como crecer a 28° C, además de requerir más de 7 días para desarrollar en los medios usuales de aislamiento (Lowenstein-Jensen, Ogawa etc...). Las especies del subgénero *PolyMycobacterium*, tienen en común el crecimiento en -- agar de Sauton y en el medio al Salicilato, así como desarro--

llar a 28° C y necesitar para su desarrollo, menos de 7 días-  
(normalmente crecen en 3 días).

Clasificación:

**Mycobacterium** subgénero MonoMycobacterium.

M. tuberculosis.

M. bovis.

M. africanum.

M. ulcerans.

**Mycobacterium** subgénero ByMycobacterium.

a.- Especies fotocromógenas

M. kansasii.

M. asiaticum.

M. lycopinogena.

b.- Especies pigmentadas.

M. avium.

M. intracellulare.

M. nonchromogenicum.

M. terrae.

M. novum.

M. gastri.

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. fortuitum.

M. chelonei subespecie chelonei.

M. peregrinum.

M. chelonei subespecie abscessus.

M. dierhoferi.

M. thamoopheos.

M. fortuitum subespecie thermophilum.

M. smegmatis.

Las siguientes tablas muestran las características -  
diferenciales de los subgéneros ByMycobacterium y PolyMycobac-  
terium.

TABLA 3.

Características diferenciales de las especies no pigmentadas - del subgénero BYMYCOBACTERIUM.

	<u>M. gastr</u>	<u>M. simiae</u>	<u>M. shimoidei</u>	<u>M. non chromogenicum</u>
Medio con Rifampicina	-	+	+	+
Niacina.		+	-	-
Medio con etambutol.		-	-	-
Catalasa Semicuantitativa.			-	+
Arilsulfatasa.				+
Hidrólisis del Tween 80.				

M. tri  
M. terrae M. avium. M. intracellulare vialé.

Medio con Rifampicina.	+	+	+	+
Niacina.	-	-	-	-
Medio con Etambutol.	-	+	+	+
Catalasa Semicuantitativa.	+	-	-	-
Arilsulfatasa.	-	-	+	+
Hidrólisis del Tween 80.		-	-	+

El medio con rifampicina contiene 25 g/ml.

El medio con etambutol contiene 5 g/ml.

Tomada: Revista latinoamericana de Microbiología. Vol. 19, 1977.

TABLA 4.

Características diferenciales de las especies que componen al subgénero BYMYCOBACTERIUM.

	<i>Mycobacterium</i> <i>kansasii</i> .	<i>Mycobacterium</i> <i>asiaticum</i> .
Medio NH <sub>2</sub> OH (0.25 mg/ml).	-	+
Medio NH <sub>2</sub> OH (0.5 mg/ml).	-	+
Hidrólisis de Tween 80.	+	-
Reducción de Nitratos.	+	-
Crecimiento a 45° C.	-	+

	Medio con Etambutol.	Catalasa Semicuantitativa	Hidrólisis Tween 80.
<i>Mycobacterium</i> <i>scrofulaceum</i> .	+	+	-
<i>Mycobacterium</i> <i>gordonae</i> .	-	+	+
<i>Mycobacterium</i> <i>seulense</i> .	-	+	-
<i>Mycobacterium</i> <i>xenopi</i> .	+	-	-
<i>Mycobacterium</i> <i>engbaekii</i> .	Se diferencia de las especies restantes por su pigmento rosa.		

El medio con Etambutol contiene 5 g/ml.

La catalasa semicuantitativa: la altura de la columna debe ser igual o superior a 45 mm.

Tomadas de: Revista latinoamericana de Microbiología. Vol. 19, 1977.

TABLA 5.

Características diferenciales de las especies que componen el subgénero POLYMYCOBACTERIUM.

	Nitratos	Catalasa Semicuantitativa.
<u>M. flavescens.</u>	+	-
<u>M. tokaiense.</u>	-	+
<u>M. gadium.</u>	+	+
<u>M. diernhoferi</u>	-	-

	Pigmento	Catalasa	Nitratos	Galactosidasa
<u>M. fortuitum.</u>	-	-	+	-
<u>M. vaccae.</u>	+	-	-	-
<u>M. parafortuitum.</u>	+	-	+	-
<u>M. aichiense.</u>	+	+	-	-
<u>M. gilvum.</u>	+	+	+	-
<u>M. valentiae.</u>	+	-	+	+

	Pigmento	Catalasa	Nitratos	Desarrollo Acti- 450C.	Acti- ciana.
<u>M. aurum.</u>	+	-	-	-	-
<u>M. neoaurum.</u>	+	-	-	-	+
<u>M. chubuense.</u>	+	-	+	-	+
<u>M. aqri.</u>	+	+	+	+	+
<u>M. obuense.</u>	+	+	-	-	NT
<u>M. duvalii.</u>	+	+	+	-	+
<u>M. chitae.</u>	-	+	+	-	-
<u>M. thermoresistible.</u>	+	+	+	+	+
<u>M. phlei.</u>	+	-	+	+	+

Nt; no se tienen datos acerca de esta prueba.

Tomada de: Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol. 19, 1977.

## Continuación Tabla 5.

Xilosa como fuente de carbono galactosidasa		
<u>M. phlei.</u>	+	+
<u>M. aurum.</u>	+	-
<u>M. neoaurum.</u>	+	-
<u>M. chubuense.</u>	+	-
<u>M. agri.</u>	+	-
<u>M. obuense.</u>	+	-
<u>M. duvalii.</u>	-	-
<u>M. chitae.</u>	-	-
<u>M. thermoresistible.</u>	-	-

Pigmento amarillo.	
<u>M. chelonei subespecie.</u> <u>chelonei.</u>	-
<u>M. rhodesiae.</u>	+

Cabrada - Bravo y Pérez - Rostro en 1970, realizaron un estudio diferencial del género *Mycobacterium* en el que se valoró la capacidad de reducir el salicilato en catecol y su tolerancia al ácido pícrico. (18).

La reducción del ácido pícrico y del ácido salicílico por las *Mycobacteria* se ha estudiado con interés por los japoneses. Tsukamura demostró la conversión del salicilato en catecol, empleando cepas de *M. fortuitum* en medio sintético de Sauton -- (136); observó que el medio tomaba un color oscuro después de cuatro días de incubación. El mismo autor logró demostrar por cromatografía y por medio de los espectros de absorción, que el producto de color negro tenía una absorción máxima a 275 nm. correspondiente al catecol (18).

Se sabe también que la producción del salicilato es positiva en *M. borstelense*, *M. abscessus*, *M. peregrinum* y la mayoría de las cepas de *M. fortuitum*.

La tolerancia al picrato se aprecia cuando existe un desarrollo abundante de la cepa y, ocasionalmente, se acompaña de un cambio en la pigmentación del medio, de amarillo canario hasta café oscuro.

Se ha demostrado que la mayoría de las *Mycobacteria* del Grupo IV (crecimiento rápido) tolera al picrato, excepto, *M. borstelense*. Las especies de crecimiento lento, en general,

no toleran al picrato, con algunas excepciones.

La diferenciación entre M. tuberculosis y M. bovis - fue estudiada por Nogueira y Carvajal (88) el estudio de 21 cepas de Mycobacteria de diferentes especies cultivadas en medio de Lowenstein-Jensen, caldo - papa - glicerina, bilis, papa - glicerina y sales biliares - caldo - papa glicerina, permitió demostrar la observación de Calmette sobre la inhibición de las Mycobacteria de origen humano en medios con bilis de bovino, que se debe a las sales biliares y no a la bilis total. - Así mismo, los autores comprobaron que las Mycobacteria de origen bovino crecen en medios de cultivo con sales biliares y -- ejercen cambios en los componentes de éstas.

Por cromatografía en capa fina y usando el solvente - n- butanol, ácido acético, agua (4:1:4), se demostró la existencia de seis componentes en las sales biliares de bovino. -- Con este procedimiento pudo demostrarse que M. bovis produce un patrón de transformación específico de estos componentes y origina la aparición de una nueva mancha menos polar, posiblemente por una transformación cetónica, y que se identifica por el color que produce al revelarla. Las demás Mycobacteria presentan patrones de transformación diferentes de M. bovis.

3.- Métodos químicos utilizados para la clasificación de Mycobacteria no tuberculosa.

Smith y col. (118) caracterizaron las especies micobacterianas utilizando cromatografía en columna y espectroscopía infrarroja para detectar micococerenatos de fioceral específicos.

Posteriormente, se publicaron muchos estudios basados en cromatografía en capa fina, para análisis de lípidos y glicolípidos con el fin de clasificar a las Mycobacteria no tuberculosas.

Jenkins, Marks y Schaefer (70) realizaron un estudio de Mycobacteria de desarrollo rápido no cromogénicos y oportunistas, designadas como Grupo IV de Runyon, utilizando cromatografía de lípidos en capa fina sobre sílica gel y pruebas de seroaglutinación estas dos últimas técnicas usadas por primera vez para clasificar a las Mycobacteria se complementan perfectamente. Tanto los análisis de lípidos, como las pruebas de seroaglutinación y consumo de aglutininas específicas, dan resultados que permiten la identificación de las siguientes especies: M. fortuitum, M. peregrinum, M. borstelense y M. abscessus.

Tsukamura y Mizuno (136) diferenciaron las especies micobacterianas incubando con  $S^{32}$  por medio de la metionina y obtuvieron diferentes patrones cromatográficos de lípidos con manchas radioactivas.

La pirólisis con cromatografía gas - líquido de células completas, fue utilizada satisfactoriamente por Reiner y col<sup>(100)</sup> para la identificación de diferentes cepas de *Mycobacteria* y así poderlas clasificar.

Lucchensi y col. (134) fueron los primeros en demostrar que las *Mycobacteria* podían diferenciadas por cromatografía gas - líquido por medio de extractos lipídicos metilados. Thoen (134) demostró con más detalle que *M. kansasii* y *M. marinum* podían ser distinguidos de otras especies por la ramificación características de las cadenas de ácidos grasos.

Larsson y Mardh (101) observaron diferencias consistentes entre esteres metílicos de ácidos grasos y metil glicósidos trifluoroacetilados de células completas lisadas con metanol, sobre 10 cepas de *M. avium*, *M. kansasii*, y *M. tuberculosis* trifluoroacetiladas.

Tinsdall, Roberts y Anhalt (134) en 1979 identificaron y clasificaron especies micobacterianas utilizando cromatografía gas - líquido. Los microorganismos fueron saponificados en NaOH con metanol y la mezcla fue tratado con  $BF_3$  en metanol extrayendose la porción lipídica con una mezcla de hexano y cloroformo. El esquema de clasificación fue el siguiente: de 81 aislamientos, el 64% fue identificado hasta el nivel de especie y el % restante hasta el nivel de grupos de no más de

2 o 3 especies.

Los grupos consistieron de las siguientes especies: M. tuberculosis, M. bovis y M. xenopi; M. avium (complejo). - M. gastri y M. scrofulaceum; o M. fortuitum y M. chelonei. De manera particular todas las cepas de M. gordonae y M. kansasii fueron identificadas hasta el nivel de especie. M. tuberculosis fue identificado definitivamente en un 85% de los casos.

4.- Clasificación actual.- Runyon en 1974 reconoció a 10 especies micobacterianas como causantes de infección en el hombre. Estas eran: M. leprae, M. ulcerans y M. tuberculosis (complejo que incluye a M. tuberculosis, M. bovis y M. africanum). - M. avium - scrofulaceum frecuentemente abreviado como Grupo -- MAIS y que incluye a las especies de M. intracellulare, M. kansasii, M. marinum, M. simiae, M. szulgai, M. xenopi y el -- complejo M. fortuitum - chelonei. (110).

Recientemente las especies descritas como patógenas y como saprófitas se han incluido en una lista aceptada y publicada por el Comité en Bacteriología e Inmunología de la -- Unión Internacional de Lucha contra la Tuberculosis. (58).

La tabla 7 muestra las especies del género Mycobacterium que han sido aceptadas por este Comité.

Muchas de las especies mencionadas no se encuentran

con frecuencia. M. africanum es una especie intermedia entre - otras dos que son M. tuberculosis y M. bovis y actualmente su distribución geográfica está limitada a las regiones africanas. M. ulcerans produce ulceraciones dérmicas y el microorganismo desarrolla lentamente, su temperatura óptima es de 33° C y no todos desarrollan a 25 o a 37° C.

M. asiaticum se ha aislado de lesiones pulmonares en monos y por hallazgos de R. Good (58); en raras ocasiones, puede estar asociado con enfermedades en el hombre. Puede ser confundido con algún otro fotocromógeno en base sus características coloniales.

Existen escotocromógenos no patógenos que colonizan la cavidad oral y deben ser diferenciados de las cepas patógenas.

M. avium y M. intracellulare son especies muy relacionadas y no pueden ser efectivamente separadas en base sus características culturales. La tipificación serológica, el uso de pruebas cutáneas con antígenos específicos y las pruebas de patogenicidad, se han utilizado para lograr la separación de las especies (22).

M. malmoense aislado en Suecia y M. haemophilum aislado en Israel son 2 nuevas especies cuya distribución es aún poco conocida (58).

Los procedimientos serológicos han sido de mucha utilidad para identificar y clasificar a las Mycobacteria no tuberculosas y en estudios epidemiológicos. Recientemente los 56 sueros utilizados para tipificar al complejo M. avium, se han reducido a 6 lotes en función de simplificar las pruebas de aglutinación. En vista de que las cepas utilizadas para la producción de antisueros no se han estandarizado, la reproducción de los resultados no es muy factible. Sin embargo, el procedimiento es útil para identificar 28 serotipos del complejo M. avium, 3 tipos de M. scrofulaceum, 7 tipos de M. gordonae y 2 tipos de M. marinum y M. fortuitum, M. chelonae, M. kansasii y M. szulgai que están compuestos de tipos homogéneos.

La tabla 8 muestra los serotipos micobacterianos actualmente reconocidos por pruebas de aglutinación.

En 1954, cuando Timpe y Runyon (36) clasificaron a los microorganismos ácido-alcohol resistentes relacionados con infecciones en el hombre, surgió el término atípicos para describir a las Mycobacteria no tuberculosas. Actualmente se conoce que no son atípicas del género y tienen características reproducibles para lograr su identificación y los términos más apropiados para designarlas son: Mycobacteria no tuberculosas o Mycobacteria diferentes de bacilo tuberculoso.

TABLA 6.

<u>Grupo de Runyon.</u>	<u>Nombre del Complejo.</u>	<u>Especie</u>	<u>Sinónimo Incorrecto.</u>
1		<u>M. leprae.</u>	
		<u>M. ulcerans.</u>	buruli.
	TB	<u>M. tuberculosis.</u>	
		<u>M. bovis.</u>	
		<u>M. marinum.</u>	balnei, platypoecilus.
		<u>M. kansasii.</u>	luciflavium.
		<u>M. simiae.</u>	habana.
2	Scrofulaceum	<u>M. scrofulaceum</u>	marianum, parafini cum
		<u>M. szulgai.</u>	
		<u>M. gordonae.</u>	aquae.
		<u>M. xenopi.</u>	littorale.
	Avium	<u>M. avium.</u>	
		<u>M. intracellulare</u>	Battey, brunense.
3	Terrae.	<u>M. nonchromogenicum.</u>	
		<u>M. novum.</u>	
		<u>M. terrae.</u>	
		<u>M. triviale.</u>	
4	Fortuitum.	<u>M. fortuitum.</u>	ranae, minatti, giae.
		<u>M. chelonae.</u>	borstelense.

M. chelonei subes runyonii, abce  
pecie chelonei. ssus.

M. diernhoferi.

M. flavescens.

M. phlei. moelleri.

M. smegmatis.

M. vaccae.

Tomada de: Manual of Clinical Microbiology 1974 Cap.

TABLA 7.

Especies del género Mycobacterium aceptadas por el Comité en --  
Bacteriología e Inmunología de la Unión Internacional de Lucha-  
contra la Tuberculosis.

<u>Grupo.</u>	<u>Patógeno estricto o potencial.</u>	<u>Patógeno ocasional o no Patógeno.</u>
Desarrollo len- to o no culti- vables y pató- genos estrictos.	<u>M. tuberculosis.</u> <u>M. bovis.</u> <u>M. africanum.</u> <u>M. ulcerans.</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. Fotocromóge- nos.	<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. chelonie.</u>	<u>M. vaccae.</u> <u>M. smegmatis.</u> <u>M. phlei.</u> <u>M. parafortuitum.</u> <u>M. neoaurum.</u> <u>M. thermoresistibile.</u> <u>M. chitae.</u> <u>M. goodii.</u> <u>M. gilvum.</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. senegalense.</u>	

Tomada de: Clinical Microbiology Newsletter. Vol. I -

No. 20, Oct. 1979.

TABLA 8.

<u>Complejo o especie.</u>	<u>Tipos</u>	<u>Tipos por nombre. o número antiguo.</u>
<u>Complejo M. avium tipos avium e intracellulare.</u>	1, 2, 3	<u>M. avium</u> 1, 11, 111
	4	IV
	5	V
	6	VI
	7	VII
	8	Davis
	9	Watson
	10	11a
	11	11b
	12	Howell
	13	Chance
	14	Boone
	15	Dent
	16	Yadle
	17	Wilson
	18	Altman
	19	Darden
	20	Arnold
	21, 22	
	23	Brockett
	24, 25	
	26	Cox
	27	Harrison
	28	
<u>scrofulaceum</u>	41	<u>scrofulaceum</u>
	42	Lunning
	43	Gause
	44	Cole
<u>M. gordonae.</u>	1	Kowal
	2	Marshall
	3	Szent
	4	Puntal
	5	Moore
	6	Lanton
	7	Brown
<u>M. marinum.</u>	1, 2	
<u>M. fortuitum.</u>	1	<u>M. peregrinum.</u>
	2	
<u>M. chelonae.</u>	Homogéneo	<u>M. abscessus.</u>

M. szulgai  
M. kansasii

Homogéneo  
Homogéneo

Tomada de: American Review of Respiratory Disease. Vol. 119,  
1979.

## CAPITULO III

### PATOLOGIA

El descubrimiento del bacilo tuberculoso por Koch -- fue anunciado en 1882 y después, en los finales de ese siglo, -- se describieron una gran variedad de Mycobacteria de origen -- bovino, de aves, de peces, de reptiles y saprófitas. En los -- primeros años del siglo 20 se publicaron reportes esporádicos -- de aislamientos de Mycobacteria no tuberculosas a partir de -- especímenes clínicos, pero las únicas Mycobacteria considera-- das como patógenas para el hombre eran M. tuberculosis y M. -- bovis y los clínicos estaban demasiado ocupados en hacer fren-- te a la tuberculosis ordinaria. En los años 50 cuando los cul-- tivos comenzaron a realizarse en forma rutinaria, más que el -- simple frotis para bacilos ácido - alcohol resistentes y cuan-- do la prevalencia de la tuberculosis comenzó a declinar, sur -- gió un nuevo concepto de la infección micobacteriana.

La correlación entre los hallazgos clínicos y los -- bacteriológicos llevaron a un mejor entendimiento entre las -- pequeñas pruebas cutáneas con tuberculina y las infecciones -- con microorganismos diferentes del bacilo tuberculoso..

Cuando se describieron el granuloma de alberca y la -- úlcera de Bairndale, numerosos artículos de destacadas publi-- caciones durante los años de 1953 y 1954, trajeron la eviden --

cia de otras Mycobacteria que son patógenos importantes para el hombre.

El propósito de este capítulo es revisar y compendiar el conocimiento actual de las Mycobacteria no tuberculosas y las enfermedades asociadas con ellas.

## 1.- Enfermedad Pulmonar.

1.1.- Consideraciones clínicas. La enfermedad pulmonar crónica semejante a la tuberculosis representa el más importante problema clínico asociado con las Mycobacteria no tuberculosas, siendo M. kansasii y M. avium - intracellulare los patógenos más comunmente aislados. Un gran número de reportes incluyendo casos en los que se trata con más de una especie micobacteriana han sido publicados. De entre estos algunos especializados en casos de enfermedad pulmonar asociada con M. kansasii, otros concernientes a la enfermedad causada por el complejo M. avium - intracellulare (2, 4) y algunos más que enfatizan la importancia de especies como M. scrofulaceum y el complejo M. fortuitum - chelonae (43, 69, 129).

Existen diferencias sutiles con respecto a la tuberculosis ordinaria, que caracteriza el caso promedio.

La causa verdadera de la enfermedad pulmonar, generalmente no es descubierta en primera instancia por el laboratorio y justamente como en la tuberculosis, existe una gran va

riacion en la historia clínica, que van de desde lesiones mínimas asintomáticas descubiertas por un exámen radiológico rutinario, hasta una repentina hemóptisis con severa cavitación.

El caso promedio de enfermedad pulmonar debida a M. kansassi o M. avium - intracellulare se presenta en hombres de raza blanca con edad aproximada de 48 años con antecedentes de enfermedad pulmonar crónica, tal como obstrucción pulmonar crónica o silicosis con historia de tos productiva, sudor nocturno, febrículas y pérdida moderada de peso, de no más de -- tres meses de duración.

La radiografía muestra fibrosis y una cavidad de paredes delgadas a nivel del lóbulo superior derecho, siendo el esputo positivo a la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes.

Las investigaciones revelan que no existen en estos pacientes antecedentes familiares de tuberculosis, ni ninguna posibilidad o fuente de contagio (162)

1.2.- Condiciones predisponentes. La mayoría de los reportes -- estudiados revelan que la enfermedad pulmonar generalmente ocurre en hombres de edad media, presentandose como enfermedad -- pulmonar crónica.

Las lesiones pulmonares pre-existentes se han notado en casi todos los casos reportados de enfermedad pulmonar cau-

sada por M. fortuitum - chelonae y M. scrofulaceum y aproximadamente con la mitad de los casos reportados de M. kansasii.

Las condiciones predisponentes más comunes son la pneumoconiosis, tuberculosis previa, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiectasias y aspiración crónica por enfermedad esofágica. Sin embargo, se debe enfatizar que la enfermedad puede ocurrir también en mujeres, hombres jóvenes y en hombres de edad media, sin una aparente enfermedad pulmonar o deficiencia en inmunidad celular.

La relación entre la silicosis y las enfermedades micobacterianas es un hecho bien estudiado; los cuyos silicóticos revelan una enfermedad progresiva y crónica cuando se les inocular Mycobacteria de baja patogenicidad tales como el BCG. De un total de 89 casos de enfermedad pulmonar causada por el complejo M. avium-intracellulare en Inglaterra y Escocia, casi la mitad ocurrió en hombres que tenían ocupaciones relacionadas con el manejo o que estaban en contacto con polvo, como los mineros de las minas de carbón que presentaban pneumoconiosis. De acerca de 83 lijadores de la ciudad de New Orleans con antecedentes de silicosis, 22 revelaron complicación por infección micobacteriana, 3 debido a M. intracellulare, 10 a M. tuberculosis y 9 a M. kansasii. La importancia de la exposición al polvo se ha estudiado en Escocia y Sudáfrica; en ambas naciones se encontró que los mineros están --

predispuestos a una infección por M. kansasii. Otra ocupación predisponente es la de los soldados; muchos de los casos reportados en Cleveland de enfermedad pulmonar asociada con Mycobacteria no tuberculosas, corresponden a pacientes que tenían esa ocupación (162).

La enfermedad esofágica que causa aspiración crónica, se ha considerado como condición predisponente para la aparición de enfermedad pulmonar micobacteriana. De los 17 casos reportados, todos están asociados específicamente con el complejo M. fortuitum - chelonei (16).

La incidencia de enfermedad micobacteriana en pacientes con enfermedades malignas fue estudiada por Ortbals y Marr (91). Revisaron 162 casos con infección micobacteriana y los microorganismos responsables en un gran número de pacientes fueron M. kansasii y M. avium intracellulare. En el hospital M. D. Anderson y en El Tumor Institute, 65 casos de cada 100, 000 pacientes tenían infección micobacteriana. De 59, 29 estaban infectados con M. tuberculosis, 30 con Mycobacteria no tuberculosa y de éstas, las más frecuentemente aisladas eran M. kansasii y M. fortuitum.

La incidencia de infección micobacteriana en pacientes con cáncer es tres veces mayor que la de la población general del estado de Texas (91).

Otra de las condiciones predisponentes encontradas-

por Ortbals y Marr en su estudio fueron: enfisema pulmonar, - alcoholismo crónico, diabetes mellitus, enfermedad renal y te rapia con esteroides.

1.3.- Diagnóstico. Debe enfatizarse que los hallazgos encontra dos por un estudio radiológico de tórax en una micobacterio -- sis, pueden también encontrarse en la tuberculosis ordinaria, - por lo tanto no pueden ser usados para dar un diagnóstico defi nitivo. Los hallazgos radiológicos que pueden considerarse con ciertas características diferenciales son; incremento relativo de la extensión de la cavidad en el pulmón afectado, las cavi dades son de paredes delgadas con una infiltración menos densa alrededor de éstas, la lesión es menos broncogénica, los seg-- mentos implicados son el apical y anterior en la parte supe -- rior de los lóbulos, la reacción pleural es menor en la base, - se observan áreas irregulares translúcidas y líneas suaves ra diando de cada lesión. Tsukamura apunta que probablemente las cavidades de paredes delgadas representan una infección prima ria, pero las lesiones fibrosas de la cavidad son producto de una infección secundaria de un pulmón previamente dañado (162)

El exámen histológico de tejido pulmonar obtenido -- por biopsia o extirpación quirúrgica tampoco ayuda mucho para realizar un diagnóstico diferencial . Sin embargo, algunos pun tos han sido mencionados como característicos y son: la fre --

cuencia de endobronquitis, así mismo el incremento en el número de macrófagos y células gigantes con gotas de grasa, y cavidades irregulares con comunicaciones bronquiales recubiertas de tejido granuloso. Por otra parte, los hallazgos histopatológicos de pulmones de pacientes infectados con M. avium -- intracellulare no pudieron ser distinguidos de las lesiones producidas por la tuberculosis ordinaria por 27 distinguidos-patólogos (37).

Las pruebas cutáneas diferenciales son útiles en el diagnóstico en ciertas situaciones. Los antígenos se elaboran utilizando cepas bien conocidas, cuyos filtrados de cultivos se purifican parcialmente para obtener derivados protéinicos. Debido a que los antígenos se encuentran distribuidos sobre todas las especies micobacterianas, no es raro encontrar reacciones cruzadas extensas que interfieren para dar una correcta interpretación.

Además, los antígenos disponibles no están estandarizados en su potencia en cuyos, para ser bioequivalentes en humanos mono infectados; los disponibles actualmente y utilizados extensamente en los EE.UU, son preparados por el CDC (Center for Disease Control), bajo las siguientes siglas PPD-B de una cepa de M. intracellulare; PPD-G de una cepa de M. scrofulaceum; PPD - Y de una cepa de M. kansasii. Estas pruebas parecen tener mayor utilidad cuando se realizan en niños pequeños,

debido a que estos pacientes no han tenido tiempo para sensibilizarse ante otros antígenos micobacterianos y reaccionan -- como los cuyos mono infectados. Sin embargo, las infecciones -- con M. scrofulaceum y M. avium intracellulare no pueden ser -- distinguidas una de la otra.

El aislamiento de las Mycobacteria no tuberculosas - puede ser persistente o intermitente; la persistencia de cultivos positivos con un gran número de microorganismos de la especie dada se presenta cuando el pulmón se encuentra previamente dañado. La obtención de cultivos intermitentes se asocia -- con una colonización más lenta del tracto respiratorio, sin -- una aparente relación con la enfermedad.

1.4.- Patogenia. La patogénesis de la enfermedad pulmonar en el adulto es algo que todavía permanece oscuro sin embargo, -- hay 2 teorías: la. posiblemente se debe a la aspiración de aerosoles infectados que una vez localizados proliferen en áreas específicas del pulmón y 2da. puede deberse a la reactivación de un bacilo latente e inactivo que ha sido adquirido previamente.

Los resultados de pruebas cutáneas en niños y en reclutas navales jóvenes, sugiere que la infección ocurre en una época temprana de la vida; sin embargo, la enfermedad pulmonar en niños no es común.

Tsukamura enfatiza que las diferencias radiológicas entre la infección primaria y la secundaria, ocurriendo es esta última en la época de vida media del adulto, dan ejemplos de una aparente sobreinfección de cavidades tuberculosas por M. intracellulare (162).

Son necesarios más estudios para aclarar los mecanismos de la patogénesis.

1.5.- Enfermedad pulmonar asociada con especies menos comunes.

M. xenopi. Desde que se reconoció como patógeno para el hombre en 1965, un total de 50 publicaciones mencionan casos de enfermedad pulmonar debida a M. xenopi (46, 132).

No existen características distintivas, ni condiciones predisponentes diferentes en este tipo de infección.

M. scrofulaceum. Reportes que describen la experiencia en el manejo de infecciones por Mycobacteria no tuberculoasa provenientes de muchos hospitales y de laboratorios de referencia, incluyen una pequeña proporción de casos de enfermedades pulmonares asociadas con Mycobacteria escotocromógenas (129).

M. szulgai. Sólomente se han reportado 10 casos de enfermedad pulmonar asociada con esta especie micobacteriana (84, 110). No existen características especiales para este ti

po de enfermedad comparada con las causadas por otras Mycobacteria.

M. simiae. Se han publicado solamente 2 casos de infección pulmonar por este microorganismo, el primero de una mujer de 88 años de edad procedente de Los Angeles y el segundo de un hombre que tuvo un carcinoma pulmonar, que se había extirpado previamente al desarrollo de la enfermedad.

La cepa se obtuvo por cultivo de material obtenido por lavados bronquiales y de tejidos extirpados con granulomas caseosos. Este paciente era manejador de monos.

M. fortuitum - chelonei. La dificultad en establecer la relación entre estas Mycobacteria de desarrollo rápido y la enfermedad pulmonar ha sido discutida por muchos autores (4, - 30). En algunos casos, sin embargo, se ha establecido su asociación con enfermedades invasivas. En un reporte de 9 casos se aisló M. chelonei de cavidades de lesiones caseosas de tejidos pulmonares extirpados. La edad de los pacientes fluctuaba entre los 25 y los 50 años (137).

De una serie de 7 casos bien conocidos y estudiados procedentes del Hospital Nacional Judío en los Estados Unidos, se aislaron en 5 casos M. fortuitum y en otros 2 M. chelonei. Había hemóptisis, tos y pérdida de peso en 6 de los casos, tres de los pacientes sufrían de artritis reumatoide y 2 de ellos presentaban anergia cutánea, pero la respuesta de los linfocitos a la fitohemaglutinina fue normal. El estudio histológico

del pulmón en 2 de los pacientes demostró granulomas caseosos. Uno de los pacientes murió de una hemorragia pulmonar masiva, y los autores concluyen que las Mycobacteria de desarrollo rápido pueden producir lesiones pulmonares cavitarias potencialmente fatales (43).

1.6.- Epidemiología. En contraste con la tuberculosis, la enfermedad pulmonar asociada con Mycobacteria no tuberculosas generalmente no se trasmite de persona a persona y la teoría -- más aceptada es que el contagio se realiza por el contacto con alguna fuente del medio ambiente. Sin embargo, se han realizado numerosas revisiones de casos con respecto a la posibilidad de transmisión de la enfermedad por un contacto de persona a persona. En 1963 se describió un caso de un hombre y de su esposa, en el cual el hombre tenía una colonización M. xenopi en un pulmón previamente dañado, y en su esposa se demostró la colonización de tracto respiratorio por el mismo microorganismo. Lincon y Gilberts (162) describen el caso de 2 parientes con osteomielitis diseminada y otro reporte que describe a 2 hermanos, los cuales desarrollaron enfermedad debida a M. kansasii, ambos eran casados y vivían aparte teniendo un contacto ocasional, uno de ellos comenzó con la enfermedad un año antes que el otro.

El tipo 6 de M. intracellulare (162) se aisló en Cleveland de un pulmón dañado en una autopsia de un hombre de - -

avanzada edad y algunos años después se aisló el mismo tipo de microorganismo de un pulmón removido de su hijo. Del Hospital de Caridad de New Orleans se reportaron 9 casos de enfermedad pulmonar, en un período de 5 años, presentados en empleados -- del mismo hospital infectados con M. kansasii (162)

Hay otro reporte de 3 casos con enfermedad pulmonar asociada con M. kansasii en soldados de Ohio (162).

Existe, sin embargo, la posibilidad de que el contagio con una fuente común de contaminación en el medio ambiente, sea el mecanismo de transmisión.

## 2.- Linfadenitis Micobacterana.

2.1.- Consideraciones clínicas. La mayoría de los casos se presenta en niños de 1.5 a 5 años, sin embargo hay reportes de enfermedad en niños con edades que fluctúan entre los siete meses y 12 años. Los ganglios afectados son generalmente los parótidos, preauriculares y postauriculares, que se encuentran en la parte alta del cuello, justo abajo del maxilar, aunque los ganglios inguinales, femorales, los de la región epitroclear y los axilares pueden también ser afectados. La enfermedad es unilateral y aparentemente consiste de la formación de una sola masa de forma y tamaño indefinido, aunque los cirujanos han encontrado más de una de estas formaciones en los nódulos

dulos. No hay dolor o debilidad y los niños son clínicamente sanos.

Los nódulos progresan rápidamente hacia el ablandamiento, ruptura y formación de colecciones que drenan, estas cavidades o tractos estrechos y alargados que se extienden desde el foco de la supuración y sirven para la descarga de pus.

Algunas veces el desarrollo de la enfermedad se detiene y los nódulos pueden permanecer por un tiempo estacionarios e involucionar lentamente. La cicatrización ocurre con fibrosis y calcificación.

2.2.- Diagnóstico. Cuando se dispone de antígenos especiales, estos pueden ser útiles para realizar un diagnóstico diferencial. En relación con el agente etiológico, debido a que las reacciones al PPD-B, PPD-A ó PPD-G son generalmente mayores que las reacciones hacia la tuberculina. Estos resultados dependen del agente etiológico, porque la infección debida a M. scrofulaceum o M. avium - intracellulare pueden sensibilizar al niño hacia los tres antígenos mencionados. La infección con M. kansasii muestra reacciones cutáneas --- equivalentes tanto al PPD, como al PPD-G (obtenido de una cepa de M. kansasii) (116).

Los ganglios afectados son grandes, débiles y rodea

dos de una zona edematosa, la fiebre es prominente y puede haber signos de infección estafilocócica o estreptocócica. Los nódulos tuberculosos que se encuentran en la región supraclavicular o en el triángulo posterior del cuello están acompañados de evidencia de tuberculosis, especialmente en el pulmón.

Existen condiciones que pueden ser confundidas con una adenitis micobacteriana como son, la fiebre por el rasguño de gato, parotiditis, el tumor en las parótidas o glándulas salivales, el linfoma y el tumor metastásico.

Ocasionalmente puede ser útil la biopsia de un ganglio sólido o el aspirado obtenido de un ganglio reblandecido, para propósitos de diagnóstico. Las características histopatológicas por sí mismas, no son suficientes para diferenciar entre una tuberculosis y una adenitis micobacteriana. La fiebre del rasguño de gato y algunas otras infecciones pueden producir una inflamación de tipo granulomatoso con un carácter piogénico dimórfico.

2.3.- Agentes etiológicos. Hay tres especies involucradas, con una marcada distribución geográfica. M. kansasii domina como agente etiológico en la ciudad de Dallas (116). Estudios llevados a cabo en Australia y Alemania revelan que M. avium intracellulare dominan sobre aislamientos de otros escotocromógenos (162).

En un estudio realizado en Cleveland sobre 62 casos de niños con adenitis micobacteriana resultaron 44 cultivos positivos de ganglios linfáticos, aislándose 36 cepas de M. scrofulaceum, 6 de M. intracellulare, 1 de M. kansasii y otro de M. fortuitum. El complejo M. fortuitum -chelonei es el -- que tiene la menor proporción como agente etiológico en este tipo de infecciones (136, 162).

2.4.- Patoqénesis. El mecanismo de infección hacia los ganglios periféricos está poco aclarada, posiblemente las vesículas infectadas se rompen en la piel del pie involucrando a -- los ganglios inguinales, a los de las manos y a los de la región epitrocLEAR. En un caso de adenitis inguinal bilateral -- en una niña de 5 años de edad, la infección estaba asociada -- con vaginitis y esto sugiere que la vía de entrada del Myco -- bacterium fue la vagina.

Las áreas infectadas que pueden drenar a los gan -- glios submaxilares incluyen: la boca, la faringe, la mucosa -- gingival, los labios y la parte anterior de la cara. En algu -- nos casos la infección sigue después de la presencia de dien -- tes cariados o infectados o de la administración de anésti -- cos dentales.

Sin embargo, no existe una localización definida -- del evento.

Chapman y Guy (116) aislaron tres cepas de M. kansasii de exudados faríngeos en 43 niños normales.

Stewart encontró solamente 3 cultivos positivos de -- Mycobacteria en 912 exudados nasales y faríngeos siendo los microorganismos aislados: M. avium - intracellulare, M. fortuitum y M. scrofulaceum (162).

Debido a la localización de los ganglios en el maxilar, es natural sospechar que las áreas tonsilares son una posible vía de entrada. En resumen existe una evidencia circunstancial fuerte de que los ganglios linfáticos se infectan con Mycobacteria por una vía que se origina en la boca y el cuello, -- pero únicamente y raras veces, la entrada se ha documentado --- claramente.

Se han aislado cepas similares a aquellas cultivadas de ganglios infectados, en una pequeña proporción de exudados -- nasales y faríngeos, pero el traumatismo a la mucosa gingival -- y faríngea de los niños, puede ofrecer una vía de entrada a los ganglios submaxilares.

2.5.- Tratamiento. El tratamiento de elección es la total remoción de los ganglios infectados. Muchos investigadores han recomendado el uso de tratamiento antimicrobiano, pero no existen -- estudios controlados para fundamentar esta recomendación. En --

las infecciones causadas por M. kansasii, parece ser que hay cierta respuesta hacia las drogas, pero en las infecciones causadas por M. scrofulaceum o M. intracellulare éstas requieren un tratamiento intensivo con un régimen de tres o cuatro drogas. En ocasiones no es posible la extirpación aséptica del ganglio, debido a una previa incisión, a drenaje o una ruptura espontánea con formación de colecciones que drenan. Además, pueden existir ganglios satélites que permanezcan después de la extirpación.

### 3.- Infecciones Micobacterianas en Tejidos Blandos.

Este tipo de enfermedad incluye a una proporción significativa de Mycobacteria no tuberculosas.

3.1.- Lesiones nodulares cutáneas diseminadas y multicéntricas. Estas lesiones se han reportado raramente. M. kansasii fue el agente causal en 2 casos (67); hay otros reportes que implican a M. szulgai y M. chelonae (32, 11), y a un nuevo patógeno designado con el nombre tentativo de M. haemophilum (122, 123). La mayoría de los casos involucra a personas aparentemente normales que desarrollan lesiones nodulares que progresan hasta la úlcera de los ganglios linfáticos y formación de colecciones que drenan; en algunos casos, la lesión presenta una apariencia verrucosa crónica.

3.2.- Abscesos localizados. Existen muchos reportes de formación de abscesos localizados en sitios de inyecciones o después de un traumatismo o heridas quirúrgicas; la mayoría de estas infecciones son debidas a Mycobacteria de desarrollo rápido como M. fortuitum ó M. chelonei.

Las inyecciones de insulina, penicilina, dextranas-férricas, BCG e histamina, pueden producir abscesos.

Borghans y Stanford (11) reportan una epidemia de 50 abscesos producidos por una vacuna contra difteria - B. pertussis - tétanos y poliomielitis administrada a niños pequeños en un centro de salud de Holanda. Los abscesos mostraban ser de origen micobacteriano. En las investigaciones llevadas a cabo sobre la vacuna remanente en el centro de salud, la vía de infección no pudo ser confirmada eficazmente; pero existen evidencias circunstanciales fuertes, de que los procedimientos usados para la preparación y administración de las dosis individuales de la vacuna en particular, fueron responsables de que ocurrieran los abscesos. La respuesta a la tuberculina y a un antígeno preparado de una cepa de M. chelonei en los niños vacunados y que desarrollaron abscesos, muestra que el agente responsable de la formación de éstos es de origen micobacteriano.

### 3.3.- Abscesos formados después de un tratamiento o de cirugía.

Algunos de los casos en esta categoría, han demostrado sorprendentemente que existe un período muy largo entre el trauma original y el principio de la infección. Las heridas de guerra, las provocadas por instrumentos punzocortantes, o por navajas de podadoras de césped y espinas, constituyen un mecanismo que ha servido para inocular las Mycobacteria dentro de los tejidos.

3.4.- Abscesos locales cutáneos. Se reporta el caso de un absceso en la glándula tiroidea producido por M. chelonae, en una niña de 4 años de edad con antecedentes de una infección en vías respiratorias altas. La enfermedad se caracterizó por la presencia de tos, fiebre, debilidad en el cuello y la formación de una masa en la parte media de este último. No existían antecedentes familiares de tuberculosis, de enfermedad en la tiroides o de cáncer (62). También se reportó la formación de un absceso en la cauda équina debido a M. fortuitum; en este caso, tampoco hay una historia familiar o antecedentes de traumatismo que expliquen la infección localizada (162).

3.5.- Granulomas cutáneos y úlceras. Las infecciones más comunes micobacterianas de tejido blandos, son el granuloma de alberca y el granuloma producido por abrasión con tanques que se -

utilizan en la pesca (178). Estas lesiones se han observado - en personas que trabajan en la playa o que viven en algún ambiente de tipo marino. Las lesiones aparecen como un grupo de pápulas en una extremidad, con una subsecuente ulceración y - formación de costras. El agente causal de esta infección es M. marinum el cual vive y se puede reproducir tanto en aguas dulces como en agua salada. Hay dos variedades de infección producida por M. marinum, una de ellas llamada de tipo esporotri - coide debido a que las lesiones se asemejan a las producidas - por Sporotrichum schenckii (1) y otra que se asemeja a la - leishmaniasis cutánea. De esta última existe un reporte de Z. Even - Paz, H. Hass y E. Rosenman (94) de 10 casos de infe - cciones cutáneas ocasionadas por M. marinum en Israel.

La mayoría de las infecciones fueron contraídas por personas que visitaron lagunas contaminadas localizadas en -- Ein Feshka en los mares del sur de Jérico. En los pacientes - se observaron tres tipos de lesiones: el primer tipo de le -- sión, presentado en todos los casos consiste de nódulos o pla -- cas inflamatorias crónicas de 1 a 4 cm de diámetro, con esca -- mas y costras con ulceración en la superficie, por debajo de -- las costras había exudado purulento. El segundo tipo de le -- sión está presente en la mayoría de los casos y consiste en - pequeñas pápulas; el tercer tipo de lesión se observó en cuar --

tro de los 10 pacientes y consiste de uno o más quistes subcutáneos o intradérmicos.

En las biopsias y exudados se observaron bacilos -- ácido-alcohol resistentes y la reacción intradérmica para la leishmaniasis fue negativa, siendo positiva la reacción al -- PPD.

Los microorganismos pueden ser introducidos en la piel por una gran variedad de vías o mecanismos, además de la abrasión de la piel y el contacto con aguas contaminadas, como por mordedura de delfines (49), raspaduras con caparzones, puás y ostras (32).

M. marinum se ha aislado de acuarios caseros, cultivando materiales de pescados infectados, arena y caracoles.

La infección superficial con M. marinum por lo general cicatriza espontáneamente, pero puede persistir por muchos meses, ocasionando mucha incomodidad para el paciente y esto puede no garantizar el éxito del tratamiento.

La lesión necrótica, indolora, de la piel y áreas adyacentes conocidas como la úlcera de Bairnsdale en Australia y como la úlcera Buruli en Africa, fue descrita por primera vez en 1897 por Sir Albert Cook en Uganda. En 1948, la enfermedad y el agente causal fueron descritos en publicaciones procedentes de Australia. La enfermedad es conocida en muchas

áreas tropicales del mundo, pero es común encontrarla más frecuentemente en el Africa Central, donde es una causa importante de incapacitación. Comienza como un nódulo eritematoso, localizado generalmente en los brazos o en las piernas, progresa gradualmente hasta la formación de una úlcera indolora, con una base necrótica y bordes gruesos indeterminados.

En las áreas necróticas se encuentran numerosos racimos de bacilos ácido alcohol-resistentes. El mecanismo por el cual el hombre se infecta no se ha determinado. La infección es muy común en niños de 5 a 14 años. Existen evidencias de que el hombre se infecta por el contacto con la vegetación de zonas de clima cálido ó tropical. Se ha sugerido que los reptiles, anfibios o insectos pueden actuar como vectores; un grupo de investigadores mostró que los lagartos excretan M. ulcerans en las heces después de 11 días de una inoculación intraperitoneal con el microorganismo (76).

La más reciente publicación sobre infecciones causada por M. ulcerans es un reporte de Junio de 1981 procedente de Liberia (180). En este reporte se tratan 2 casos, el primero de ellos un niño de 8 años de edad quién presentaba una úlcera con la rodilla izquierda. Esta úlcera persistió por muchos meses produciendo rigidez y contracción de la rodilla en un ángulo de 90° , era indolora, con un olor pútrido y medía en -

tre 4 y 5 cm; las zonas adyacentes a la úlcera presentaban edema, hiperpigmentación con cicatrización que rodeaba los márgenes de la úlcera. Se sospechó osteomielitis y artritis debido a que la rodilla presentaba rigidez, pero la articulación no presentaba daño, ni dolor.

Los frotis de exudado y de biopsias mostraban la presencia de una reacción inflamatoria, constituida por fibrina, neutrófilos degenerados y linfocitos, así como numerosos bacilos ácido-alcohol resistentes. Una tinción de Brown-Hopps mostró la presencia de bacilos gram negativos y cocos y probablemente el olor pútrido se deba a esta infección secundaria. El paciente fue tratado con rifampicina y se realizó un debridamiento de la úlcera con escisión de los bordes y un injerto preliminar.

Tres meses después apareció otra úlcera localizada en la región inguinal izquierda; al no haber permitido el padre del niño que se le siguiera tratando, no se pudieron realizar más estudios diagnósticos.

El segundo paciente fue un niño de 11 años de edad con una úlcera en el brazo derecho, que al ser tratada tuvo una cura inicial; no obstante presentó posteriormente, a los pocos meses, otra úlcera en el pie derecho. Las características microscópicas de las úlceras comprenden la presencia de

una reacción granulomatosa con un infiltrado compuesto de linfocitos, histiocitos, células plasmáticas y un número pequeño de neutrófilos y eosinófilos. Se observó también la presencia de células con grasa, sin núcleo y separadas unas de otras -- por fibrina. La tinción de Ziehl - Neelsen reveló la presencia de racimos de bacilos ácido-alcohol resistentes; la existencia de éstos y de una necrosis de coagulación son características de una infección por M. ulcerans. La tinción de Brown Hopps permitió la observación de bacilos gram negativos, pero éstos se encuentran en la porción superficial del exudado, que es la localización característica de una infección secundaria.

Después de confirmado el diagnóstico y establecido el tratamiento adecuado, no fue posible seguir el curso de la infección debido a que los padres del niño prefirieron que éste fuera tratado por los tradicionales curanderos.

R.E. Krieg, C. Wayne, D.H. Connor (76) realizaron una investigación sobre la producción de una toxina de M. ulcerans; esta toxina parece ser la responsable de la formación de zonas necróticas, inflamación y destrucción de la piel y tejido subcutáneo. La toxina se obtiene de filtrados celulares, no forma parte de la pared celular, estable al calor y retiene su actividad después de la extracción con éter. Estas características, junto con las de producir una reacción inflamatoria en la piel de cuyos, hace pensar que se trata de una-

exotoxina. Durante el cultivo in vitro de M. ulcerans, la toxina aparece a la cuarta semana y se incrementa hasta la décima-semana (fase estacionaria) para desaparecer a la décima cuarta semana.

J.L. Stanford (124) realizó un estudio de 35 cepas - de Mycobacteria de desarrollo lento tipificadas como M. ulce - rang, que se sujetaron a un análisis de inmunodifusión y se -- compararon con otras especies micobacterianas. Las cepas fue - ron aisladas de lesiones úlcerosas en Australia, Malaya, Méxi - co, Uganda y Zaire. Se encontró que las especies poseen antígenos típicos de Mycobacteria de desarrollo lento y que tienen - 5 antígenos específicos de especie que las permiten clasificar como M. ulcerans.

3.6.- Tratamiento. Los métodos propuestos para el tratamiento - local incluyen la electrodesecación, congelamiento, extirpa -- ción e injerto de piel, radiación con rayos X, inyección intra - lesional de esteroides, calor local e incisiones y drenaje.

Las drogas antituberculosas han tenido poco éxito -- en estas infecciones (139).

En el caso de las lesiones producidas por M. ulcerans el tratamiento más eficiente es un régimen largo con estreptomina y rifampicina combinados con la aplicación local de calor y cirugía. La vacunación con BCG protege contra la infección -

(104).

#### 4.- Infecciones en Huesos y Articulaciones.

4.1.- Sinovia, tendones y bursa. Dechairo, Kittredge y Meyers (41) describieron un caso de artritis séptica debida a M. tri-  
viale, microorganismo que no se ha asociado a infecciones en-  
humanos. Wayne y asociados (108) clasificaron a este microor-  
ganismo dentro del Grupo III (no fotocromógenos y de desarro-  
llo lento); en este grupo los considerados como patógenos pa-  
ra el hombre son M. avium y M. intracellulare.

En este reporte, el paciente, un niño de seis meses, presentó artritis séptica en la articulación pélvica. M. tri-  
viale fue el único microorganismo aislado de un cultivo de lí-  
quido sinovial de la articulación afectada; la presencia de -  
células gigantes de Langhans en una biopsia abierta de la mem-  
brana sinovial confirma el diagnóstico. Las pruebas de tuber-  
culina fueron compatibles con una infección micobacteriana --  
por Mycobacteria diferente de M. tuberculosis, en que la reac-  
tividad al PPD es débil y las reactividades al PPD - Battey -  
son mayores a las 48 y 72 horas.

Wray Ellis (45) reporta un caso de lesiones múlti-  
ples en huesos causado por una Mycobacteria del tipo Avium --  
Battey serotipo IV. La infección fue probablemente iniciada -  
por la mordedura de un conejo pequeño, que se encontraba guar-

dado donde había gallinas.

Inicialmente la infección comenzó con un absceso en la mano donde estaba la mordedura y posteriormente se acompañó de un intenso dolor en la espalda. Dos años después existían cambios destructivos que afectaban la tercera y cuarta -- vertebrae lumbares, inflamación de la bóveda craneana, maxilar inferior y la clavícula derecha; también se produjeron abscesos en la fosa ilíaca derecha y en la región lumbar izquierda. Posteriormente las radiografías mostraron involucración de pulmones y lesiones en la sexta, séptima y octava vértebras torácicas. La gentamicina y posteriormente la clofazimina, fueron las únicas drogas a las que mostró sensibilidad el microorganismo. El paciente no respondió a la terapia presentándose paraplegia y nueve días más tarde murió.

Los microorganismos del tipo Avium-Battey se encuentran en la tierra. La distribución de las infecciones es de tipo rural, siendo los animales domésticos y salvajes, como los pájaros, los huéspedes naturales, generalmente son de baja patogenicidad para el hombre. Sin embargo, las infecciones en -- articulaciones de manos, muñecas y de la membrana sinovial, -- son muy comunes en América.

También se han descrito infecciones de articulaciones debidas a M. intracellulare involucrando el sacroilíaco, --

rodillas y túnel del carpo. En un caso descrito por E. Cheatum, Hudman y Jones (25) se describe a un paciente con una historia clínica de más de 10 años con infecciones recurrentes en las rodillas, no teniendo antecedentes de adenitis cervical inyecciones intraarticulares o infecciones sistémicas. En las rodillas había frecuentes derrames intraarticulares y dolor con sudor nocturno durante muchos meses; las radiografías de pulmones mostraban áreas de calcificación compatibles con una infección granulomatosa. Por medio de artrocentesis de la rodilla izquierda se obtuvieron 30 ml de un líquido espeso y de color ámbar, que en los medios rutinarios de cultivo no dió ningún crecimiento, pero que posteriormente desarrolló una *Mycobacteria* del Grupo III. El paciente respondió a la terapia de rifamicina, isoniacida y etambutol y las que el microorganismo era sensible in vitro.

Se realizó tipificación de antígenos de histocompatibilidad (HLA) por la relación que existe entre éstos y algunas enfermedades, entre ellas las reumatoideas. Este paciente no tenía el antígeno de histocompatibilidad HLA W27 relacionado con la espondilitis anquilosante y el Síndrome de Reiter.

W. Sutker, L. Lankford y R. Tompsett (130) discuten sobre el papel que tienen las *Mycobacteria* diferentes DE M. tuberculosis, en un artículo publicado por el Centro Médico de Medicina Interna y Ortopedia de la Universidad de Dallas, en el cual se analizan los datos clínicos de 25 pacientes con si-

novitis granulomatosa y bursitis, observados desde 1970 hasta 1977. Las lesiones ocurrieron en las articulaciones de las extremidades involucrando manos y muñecas.

Con excepción de tres pacientes, los demás no presentan infecciones en tejidos adyacentes; las lesiones son crónicas y siguen después de un trauma menor. En muchos de los pacientes se había practicado cirugía anteriormente, la inyección de esteroides o ambos. En el momento de practicar la cirugía de la sinovial, se observó la presencia de una reacción granulomatosa inflamatoria. En 20 de los pacientes se encontró *Mycobacteria* y en 15 se aisló por cultivo.

Las especies aisladas fueron en 4 de los casos *M. tuberculosis*; *M. kansasii* en seis; *M. marinum* en uno; *M. goodii* en otro; el complejo *M. avium - intracellulare* en dos y *M. chelonae* en uno.

Existían en algunos pacientes condiciones predisponentes como: linfoma, lupus eritematoso sistémico, poliomiositis o traumatismos penetrantes.

De pacientes inmunosuprimidos o con enfermedades inmunosupresoras, se han aislado *Mycobacteria* que actúan como patógenos oportunistas, capaces de producir una enfermedad invasiva, como *M. terrae* (44) que puede causar sinovitis y osteomielitis.

Se han reportado casos de infecciones en artroplastias con aplicación de prótesis por Mycobacteria de baja patogenicidad como M. fortuitum. En 2 casos reportados por E. Booth, T. Kurrus, T. A. Edwards (10), se observó que los pacientes tenían una artritis séptica asociada con una prótesis en la articulación. En uno de los casos la infección ocurrió porque el paciente efectuaba sus ejercicios en una tina especial, pero el agua estaba contaminada, el cultivo del agua -- mostró el desarrollo de M. fortuitum con el mismo patrón de sensibilidad a antibióticos que la cepa aislada del paciente.

4.2.- Médula ósea. En el Hospital Monte Sinai, entre 1969 y 1976, se aislaron diferentes especies micobacterianas de cultivos de aspirados de médula ósea, en seis pacientes que no presentaban sintomatología debida a alguna Mycobacteria y un caso adicional en el que se aisló una Mycobacteria por cultivo de secreción cístico - pancreática, de un paciente al cual se le había practicado una esplenectomía. Seis de los siete -- pacientes tenían infecciones crónicas o agudas, pero el hallazgo no es usual debido a que las Mycobacteria no tuberculosas se han aislado sólomente de pacientes con antecedentes -- de micobacteriosis pulmonar o de micobacteriosis diseminada.

El aislamiento de Mycobacteria del complejo M. avium intracellulare en tejidos reticuloendoteliales de estos sie -

te pacientes, puede reflejar una infección asintomática ó puede significar alternativamente que no tiene importancia el hallazgo. Sin embargo, debe hacerse una cuidadosa evaluación de casos similares (75).

4.3.- Infecciones dentales. El complejo M. fortuitum - chelonaei se ha aislado en una pequeña proporción de casos de adenitis cervical y presumiblemente la vía de infección comienza por la boca y el maxilar inferior. En tres casos reportados, el proceso se originó en una infección dental. En cultivos de ganglios linfáticos submaxilares de 4 pacientes, que habían sido tratados con anestésicos dentales, desarrollo M. chelonaei; las infecciones ocurrieron en el mismo sitio de aplicación del anestésico. Un caso de osteomielitis del maxilar debido a M. chelonaei coincidió con una extracción dental (162).

4.4.- Osteomielitis esternal después de cirugía de corazón.

Existe un caso reportado de Detroit, en que el paciente tenía heridas de guerra y se le practicó un reemplazo de válvula cardíaca; posteriormente a la operación desarrolló una infección fatal que afectó el mediastino, pericardio, y vasos mayores y fue causada por una cepa de M. chelonaei. El mismo microorganismo fue el responsable de un brote de 19 casos en Charlotte N.C. El padecimiento afectaba sólo a pa

cientes que habían sido sometidos a una operación a cielo abierto para efectuar un reemplazo valvular; 2 pacientes murieron de infección micobacteriana diseminada, otros tres, de complicaciones posteriores y 6 requirieron de esternectomía para controlar la infección (106).

##### 5.- Enfermedad en tracto genitourinario.

Los frotis de orina para el diagnóstico de tuberculosis no son adecuados, debido a que M. smegmatis es un contaminante común de vías urinarias bajas y de tracto genitourinario.

En un estudio de 42 casos de aislamientos de Mycobacteria por cultivo de orinas, se observó que las cepas más frecuentemente aisladas eran escotocromógenos, no identificándose a M. smegmatis o M. kansasii.

En ninguno de estos 42 pacientes existía una infección genitourinaria atribuible al microorganismo aislado.

Sin embargo, existen reportes de que M. kansasii ha sido el agente etiológico en un caso de infección renal bilateral crónica, siendo los cultivos de orina fuertemente positivos (162). Otros tres casos reportados están asociados con el complejo M. avium-intracellulare (47, 89, 95).

Se presentó una infección destructiva del riñón izquierdo y del uréter mostrando cambios microscópicos debidos a un proceso micobacteriano, en una mujer de 52 años de edad, ---

quién tuvo 2 cultivos positivos de M. avium - intracellulare (89).

Pergament, Gonzales y Fraley (95) reportan un caso de una mujer de 62 años de edad, con una enfermedad crónica de la vejiga, uréter derecho y riñón derecho, consistiendo en una avanzada tuberculosis, ya que el riñón presentaba zonas de calcificación y disfunción, existía calcificación del uréter distal y una pequeña deformación en la vejiga. Un absceso lumbar había sido drenado tres años antes, pero no se cultivó para Mycobacteria. La paciente respondió al tratamiento que incluía 4 drogas antituberculosas que se administraron por varios meses. El microorganismo responsable de la enfermedad fue M. avium - intracellulare.

De enfermedades genitourinarias debidas a M. kansasii hay un caso reportado de la Clínica Mayo. El paciente padecía una epididimitis con presencia de granulomas caseosos que fueron extirpados quirúrgicamente (64).

Se ha reportado también la existencia de infecciones asociadas aislando 2 especies micobacterianas; tal es el caso de una prostatitis granulomatosa en un hombre de 31 años de edad, con múltiples lesiones caseosas en la próstata e innumerables bacilos ácido-alcohol resistentes. De una biopsia se obtuvo el desarrollo de M. fortuitum y M. kansasii (79)

6.- Infección Diseminada. Está bien establecido que las Mycobacterias diferentes del bacilo tuberculoso pueden producir enfermedades diseminadas, especialmente en pacientes inmunodeprimidos.

La mayoría de los casos están asociados con el complejo M. avium - intracellulare y M. kansasii (80, 111).

En un estudio realizado por E. Wolinsky (162) sobre 78 casos los pacientes estudiados revelan desórdenes hematólogicos, enfermedades inmunodepresoras o tratamiento con esteroides y enfermedades en huesos y articulaciones.

La tabla 9 muestra el análisis de los 78 casos reportados con infección micobacteriana diseminada.

Los desórdenes hematológicos incluían: linfomas, pancitopenia y sarcoma de células reticuloendoteliales. Entre los pacientes con Mycobacteria de desarrollo rápido existían 4 con endocarditis y 5 con trasplante renal. En muchos de los casos no es posible determinar si las anormalidades hematológicas (por lo general pancitopenia y reacción leucemoide) son resultado de la infección micobacteriana o representan un trastorno sanguíneo primario, que posteriormente se complica con una infección micobacteriana oportunista.

M. chelonae fue el agente causal de micobacteriosis diseminada en 2 pacientes con trasplante renal. La infección-

produjo múltiples abscesos subcutáneos y osteomielitis localizados primariamente en los pies.

Los pacientes estaban recibiendo tratamiento inmunosupresor que incluía prednisona, ciclofosfamida, actinomicina D y radiaciones. La función renal de uno de los pacientes se deterioró gradualmente, manifestando síntomas de pericarditis y neumonía, muriendo posteriormente.

El otro paciente respondió al tratamiento antimicrobiano; los pacientes no tuvieron ningún contacto personal y posiblemente la fuente de infección fue la máquina de hemodiálisis o el contacto intrahospitalario con el mismo personal (59).

#### 7.- Infecciones en otros tejidos. Meningitis e infecciones oculares.

Se ha reportado muchos casos de meningitis causadas por M. kansasii y M. avium - intracellulare en pacientes inmunodeprimidos (162).

Los escotocromógenos han sido implicados en 4 casos de meningitis micobacteriana. El primer paciente fue una niña de 2 años de edad quién murió de tuberculosis miliar y meníngea; se aisló M. kansasii de un cultivo de material obtenido de las meninges en la autopsia y M. tuberculosis se aisló de un espécimen de líquido cefalorraquídeo. El segundo paciente-

fue una mujer de 46 años de edad con una meningitis criptocócica, cuyos cultivos de líquido cefalorraquídeo permitieron el desarrollo de M. intracellulare (56).

En lo referente a infecciones oculares, hay por lo menos 8 reportes de queratitis y úlceras corneales causadas por el complejo M. fortuitum - chelonae. Todas son posteriores a un traumatismo o a cuerpos extraños que se han introducido en la córnea (162).

TABLA 9.

<u>Agente</u>	<u>N. casos</u>	<u>Edades</u> 0-5, 5-15, 16		<u>Trastorno</u> <u>hematológico</u>	<u>Enfermedad</u> <u>inmunesupresora</u>
<u>M. kansasii.</u>	26	2	1 23	14	9
<u>M. avium - in-</u> <u>tracellulare.</u>	30	13	5 12	5	5
<u>Escotocromógenos.</u>	10	4	3 3	2	1
<u>De desarrollo rápi-</u> <u>do.</u>	11	0	0 11	0	5

<u>Enfermedades en huesos.</u>	<u>Mortalidad</u>
0	81%
10	73%
4	70%
1	74%

Tomada de: American Review of Respiratory Diseases. Vol. 119, 1979.

## CAPITULO IV

### AGENTES QUIMIOTERAPEUTICOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS MICOBACTERIOSIS

La respuesta al tratamiento de la enfermedad pulmonar debida a Mycobacteria no tuberculosa, depende principalmente del patrón de susceptibilidad a las drogas del agente etiológico.

M. kansasii es sensible a la rifampicina y poco resistente a las otras drogas antituberculosas. En relación con las cepas pertenecientes al complejo M. avium - intracellulare, éstas son por lo general, poco sensibles a estos agentes.

La mayoría de los investigadores recomiendan el uso de tres drogas para un tratamiento inicial, pero algunos difieren en el uso de rifampicina, dejándola para el manejo de pacientes con retratamiento. También recomiendan que la terapia debe continuarse hasta por 18 meses y algunos, inclusive, por 2 años, posteriores a que la infección haya cedido.

Las triadas de drogas más comunmente usadas son: rifampicina-isoniacida-etambutol e isoniacida-etambutol - estreptomomicina.

En relación con las infecciones producidas por M. avium - intracellulare, la respuesta al tratamiento es menor y existen muchos reportes donde recomiendan se utilicen regim

nes con 4 ó 5 drogas para iniciar el tratamiento.

Gangadharam, Pratt y Davidson (43) han realizado estudios in vitro para determinar la actividad de clofazimina -- sobre M. intracellulare, encontrando que niveles de 3 mcg/ml - tienen poder bactericida sobre el microorganismo. Este antibiótico se ha utilizado extensamente en el tratamiento de la lepra.

En un estudio posterior de los mismos autores, se -- reporta el uso de una sustancia química denominada CQQ para inhibir el desarrollo de M. intracellulare, basándose en que Mycobacterium contiene algunas formas de vitamina K.

La ubiquinona también llamada Coenzima Q se presenta en la naturaleza como una macromolécula de gran importancia -- biológica y se ha observado que estimula el desarrollo de Mycobacteria patógenas.

Se probaron análogos de la vitamina K y ubiquinona - para observar su poder antimicobacteriano específicamente con M. intracellulare. Un compuesto de esta serie, el 6 - ciclo. octilamino -5,8- quinolinequinona (CQQ) mostró actividad bactericida a una concentración de 8 mcg/ml, sobre varias cepas - salvajes de M. intracellulare. Esta sustancia química inhibe - también el desarrollo de M. tuberculosis y de las cepas de este microorganismo resistentes a isoniacida y rifampicina, a -- concentraciones de 1 mcg/ml. Sin embargo, no tiene acción so--

bre Mycobacteria de desarrollo rápido o sobre microorganismos - no ácido - alcohol resistentes. Los estudios sobre tiempo de exposición revelaron que un período de contacto de 12 horas de un cultivo de M. intracellulare con una concentración de 8 mcg/ml de CQQ, prolonga la fase lag por tres días, un período de 24 horas prolonga la fase lag indefinidamente y un contacto de 48 horas produce una rápida acción bactericida.

La proporción de que ocurran mutantes de Mycobacteria resistentes a la CQQ es del orden de 1 en  $10^4$ .

Ostenson y Bates (93) realizaron un estudio para determinar las posibles interacciones de sinergismo y antagonismo in vitro de 5 drogas utilizadas en el tratamiento de las infección causadas por M. intracellulare, obteniéndose los siguientes resultados: Etambutol-Etionamida y Etionamida-Isoniacida -- con una probabilidad de 0.05, observándose sinergismo en estas combinaciones. El antagonismo se observó en las siguientes -- Etambutol - Cicloserina, Etambutol - Caprimocina - Isoniacida - con una probabilidad de 0.01. Estos datos sugieren que el antagonismo y el sinergismo pueden ocurrir in vitro y los tratamientos a base de 5 drogas se realizan de forma empírica.

Las infecciones pulmonares debidas a M. szulgai y a M. xenopi se han tratado satisfactoriamente debido a su relativa susceptibilidad a las drogas antifímicas; sin embargo, no --

existen estudios controlados, ni un número suficiente de casos reportados para determinar los regímenes apropiados. En base a las investigaciones de laboratorio y al manejo clínico, se recomienda la rifampicina, etambutol, etionamida o estreptomina para atacar las infecciones por M. szulgai y la isoniaci- na y estreptomina para M. xenopi.

En relación con el grupo M. fortuitum - chelonae se han aplicado tratamientos intensivos a base de aminoglucósidos y la amikacina parece ser la más prometedora de estos quimioterapéuticos (29, 115, 155) junto con la etionamida y la eritromicina, y algunos reportes mencionan a la kanamicina (115).

Con respecto a las infecciones producidas por M. scrofulaceum y M. simiae, no existen estudios suficientes y por otra parte, la poca información reportada indica que la quimioterapia es inefectiva (162).

La tetraciclina, el sulfametoaxol - trimetropin y la aminociclina se han utilizado para el tratamiento de los padecimientos causados por M. marinum (72). El uso de rifampicina y etambutol para estas enfermedades se ha dejado especialmente para los pacientes que no responden a la terapia con tetraciclina o sulfametoaxol trimetropin (6). El tratamiento no requiere más de seis semanas.

En las infecciones causadas por M. ulcerans se han utilizado la rifampicina y estreptomina. La clofazimina y la isoniacida no son efectivas para combatir estas infecciones.

En un estudio publicado por el British Medical Research Council (2) se reportaron los resultados obtenidos sobre 481 pacientes sometidos por un año a tratamiento antituberculoso, provenientes de 51 clínicas de la Gran Bretaña. La finalidad de este estudio cooperativo fue evaluar que régimen era el más adecuado terapéuticamente por su efectividad, baja toxicidad y compararlo con el régimen estándar de estreptomina-isoniacida-PAS como terapia inicial, seguida de la administración de isoniacida-PAS utilizado por la mayoría de los clínicos de ese país para combatir la tuberculosis pulmonar. Debido a que el PAS produce frecuentemente reacciones colaterales en los regímenes probados se sustituyó por etambutol y rifampicina.

Se concluye que el etambutol y la rifampicina son bacteriológicamente más efectivos que el PAS, con una menor incidencia de efectos colaterales y son sustitutos adecuados del PAS en los regímenes estandar. Sin embargo, el etambutol puede causar neuritis retrobulbar con trastornos visuales graves; es importante que al paciente que se le administre la droga sea examinado con frecuencia por un oftalmólogo, para detectar cualquier trastorno en la visión. Por otra parte, en un intervalo de 3 meses no hubo evidencia de disfunción hepatocelular en los

pacientes tratados con rifampicina, aunque se presentó ictericia clínica en 1 paciente de los de la serie, que fueron tratados con rifampicina.

Los trastornos gástricos fueron comunes en los regímenes que contenían PAS y las reacciones de hipersensibilidad son atribuibles a la estreptomycinina y al PAS.

En un reporte del Centro de Tuberculosis de Madrás-(2) se indica que la disminución de los efectos secundarios - ocasionados por el PAS, está en función del modo de administración de las dosis terapéuticas y que lo más efectivo y menos tóxico, es administrarlas 2 veces a la semana y no diariamente.

El presente estudio tiene la ventaja de evaluar la eficiencia terapéutica de los diferentes regímenes así como - comparar las diferentes reacciones adversas ya sean mayores - o mínimas. Además de que es el único publicado hasta la fecha que reporta estudios controlados.

## CAPITULO V

### ASPECTOS INMUNOLOGICOS DE LAS MICOBACTERIOSIS.

#### 1.- Pruebas Cutáneas Diferenciales.

En 1980, Robert Kock describió un método para la producción de tuberculina vieja, se obtenía de un filtrado concentrado de un cultivo de M. tuberculosis, muerto mediante calentamiento; este filtrado contenía antígenos resultantes de la secreción de diferentes productos durante el desarrollo del bacilo y antígenos resultantes de la autólisis.

Florence Seibert introdujo el PPD en 1934 obteniéndolo a partir de la tuberculina vieja, por medio de una precipitación con sulfato de amonio al 50% de saturación. El contenido de polisacáridos de esta fracción proteica purificada es mínimo en relación con la tuberculina vieja; además, el PPD es el resultado de muerte bacilar por calentamiento, que provoca desnaturalización y coagulación de muchas proteínas lábiles antigénicas que pudieran tener la especificidad deseada.- Existe por lo tanto una considerable variación antigénica en los filtrados de cultivo, así como una considerable heterogeneidad molecular de los componentes antigénicos individuales.

Actualmente existe mucho interés, por parte de los bioquímicos e inmunólogos en la purificación de componentes micobacterianos antigénicos individuales, que darían grandes ventajas en la realización de pruebas cutáneas y experimentos

in vitro para estudios de laboratorios. Estos antígenos de composición conocida pueden estandarizarse por métodos gravimétricos o por análisis químicos para lograr una uniformidad antigénica de lote a lote (34).

J. Marks y col. (83) describen un método para la obtención de antígenos micobacterianos específicos de cepa, utilizados para la realización de pruebas cutáneas diferenciales en niños con adenitis cervical.

Los antígenos micobacterianos se preparan utilizando el medio modificado de Dorset y Henley. La muerte celular es producida cuando se somete al cultivo a una corriente de vapor y a una precipitación con TCA, el precipitado obtenido después de una centrifugación se lava asépticamente, redisolviéndose y filtrándose a través de una membrana estéril y se añade fenol al 0.25% como conservador; el depósito final se lava asépticamente con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al 0.02% agua destilada, acetona y éter y se seca. La proporción de proteínas se determina por el contenido de tirosina.

E.B. Solarolo, C. Larralde y L.F. Bojalil (121) estudiaron el fenómeno inflamatorio producido por diferentes fracciones de Mycobacteria. El fenómeno inflamatorio que caracteriza a la hipersensibilidad tuberculínica es habitualmente inducido por la tuberculina o el PPD, que es en realidad una mezcla de componentes bacterianos obtenidos del medio en-

que se cultiva M. tuberculosis. La heterogenicidad del antígeno y la difícil cuantificación de la respuesta inflamatoria, hacen compleja la interpretación del fenómeno de hipersensibilidad. El trabajo informa sobre los intentos de identificación o de el o los componentes con actividad inflamatoria, aislados del soma del BGG por precipitación fraccionaria con sulfato de amonio. Los principales hallazgos son: a) siete fracciones proteicas mostraron ser capaces de inducir fenómenos inflamatorios inespecíficos y específicos. b.) la actividad específica de estas fracciones es de aparición tardía (después de las 12 horas), alcanzando el máximo a las 24 horas y es en todo similar a la inducida por el PPD.

La actividad inespecífica es un fenómeno transitorio-predominantemente vascular, que se inicia antes de la primera hora después de la estimulación, con duración aproximada de -- 5 horas.

## 2.- Efecto de la vacunación con BCG en las protección contra otras enfermedades Micobacterianas.

La región de Buruli, en Uganda, es una zona donde las infecciones por M. ulcerans adquieren características endémicas.

Estas infecciones dan origen al desarrollo de lesiones ulcerosas (úlceras Buruli) que se manifiestan con más fre--

cuencia en las extremidades y que una vez establecidas pueden causar necrosis progresivas de los miembros afectados. Hasta antes de la utilización del B 663 (un derivado de la riminofe nazina), la única forma de tratamiento era la amputación de los miembros lesionados. En 1967 se realizó una encuesta tuberculínica completa de la población, que indicó que la proporción de niños con úlcera Buruli positivos a la tuberculina, era significativamente menor que la de un grupo de edad similar no infectado.

Basados en estos datos, se inició un ensayo de la vacuna BCG contra la llamada úlcera Buruli; a la mitad de la población que resultó negativa a 5 UI de PPD (menos de 6 mm), se aplicó vacuna BCG liofilizada, la otra mitad se dejó sin vacunar.

Durante el período comprendido entre junio de 1967 a septiembre de 1968, se registraron 65 casos nuevos de lesiones de Buruli en la población en estudio (21 de los 606 que recibieron la vacuna BCG y 44 de los que no la recibieron), con una tasa de protección del 47%.

El grado de protección varió con la prevalencia geográfica de la enfermedad, de solo 18% en sectores de alta prevalencia a 74% en áreas de prevalencia. Se observó que la tasa de protección disminuía con el tiempo, ya que la aparición de los síntomas en los pacientes que fueron tuberculino posi-

tivos o que recibieron la vacuna BCG tuvo tan solo un retardo de algunos meses.

De este estudio se establece que la protección contra la úlcera Buruli, se expresa como un retardo en la aparición de los síntomas. (104).

### 3.- Papel del Macrófago en la Tuberculosis.

3.1.- Cambios morfológicos en los macrófagos infectados con bacilo tuberculoso. De recientes investigaciones se ha observado que el contacto del macrófago con un número pequeño de bacilos tuberculosos o con grandes cantidades de constituyentes químicos de bacilos éstos se convierten en células epiteloides y posteriormente en células gigantes jóvenes del tipo Langhans. Los trabajos de microscopía electrónica de Sutton y Weis (8) reportan que, durante los complicados cambios que se llevan a cabo en estas transformaciones, el número y tamaño de los lisosomas aumenta, el aparato de Golgi se acompleja cuando comienza su acción secretora y produce la formación de pilas o vesículas y el número de mitocondrias se ve incrementado.

Bennet y Cohn (8), por medio de cultivos celulares, mostraron que entre los cambios de monocito circulante a macrófago tisular las mitocondrias y los niveles enzimáticos de fosfatasa ácida, citocromo oxidasa y arilsulfatasa, así como

hidrolasas se incrementan.

Dumont y Sheldon (8) trabajando con tejidos de hamster observaron que durante la fagocitosis del bacilo tuberculoso por el macrófago in vivo el bacilo estimula una serie de cambios intracelulares en los organelos. Estos investigadores encontraron que durante la fagocitosis, el bacilo tuberculoso se encuentra dentro de una vacuola fagocítica que posee una membrana bien definida, esta vacuola se rodea de lisosomas -- grandes pero no se ha comprobado que se realice una descarga enzimática de los lisosomas a la vacuola sino que esta última es engullida por los lisosomas transformando la vacuola digestiva, que al microscopio electrónico se observa que contienen en su interior partículas densas, amorfas, que probablemente representen bacilos alterados. Algunos bacilos intactos permanecieron hasta por 28 días, en estos estudios.

Learkle y Myrvick (8) han observado la permanencia -- hasta por 5 meses, de bacilos leproso murinos después de un proceso fagocítico. Estos estudios no se han realizado en animales inmunizados.

### 3.2.- Cambios bioquímicos en los macrófagos infectados con bacilo tuberculoso.

Los conocimientos arriba descritos sobre los cambios morfológicos de los macrófagos pueden ser correlacionados con

los estudios bioquímicos realizados por Lurie y su grupo en 1961, sobre células mononucleares de conejo de diferentes predisposiciones genéticas a la tuberculosis. Estos investigadores demostraron las diferencias en la utilización de algunos sustratos metabólicos, incluyendo la glucosa - 6 fosfato, por macrófagos de animales con diferentes resistencias. Sin embargo, después de la vacunación con BCG, los niveles totales de fosfatasas ácidas y proteínas celulares son similares en todos los animales con diferentes resistencias de raza.

Colwell (8) estudió las células mononucleares de especies animales con diferentes susceptibilidades, antes y después de una inmunización, encontrando que los animales inmunizados tenían niveles de fosfatasa ácida más elevados que los no inmunizados. Pero los niveles de glucuronidasa eran significativamente más altos los animales normales como las ratas, que en los suyos inmunizados.

Además, se observó que los extractos de bacilo tuberculoso inhibían la glucuronidasa de los suyos normales, pero no de los animales inmunizados.

Myrvick demostró que la inoculación con bacilo de Calmette y Guerin por vía aérea, ocasionaba que los macrófagos alveolares utilizaran una vía colateral para la síntesis de glucosa y que el metabolismo fuera más rápido. También ob-

servó un incremento en la concentración de fosfatasa ácida en los lisosomas de los macrófagos.

Saito y Suter (111, 112, 113) encontraron que los niveles de fosfatasa ácida y glucuronidasa se encuentran incrementados en los macrófagos de animales inmunizados con BCG.

Otros estudios reportan el hallazgo de descenso en los niveles de deshidrogenasas succínica y maleica y un aumento en los niveles de nicotín adenin dinucleótico y fosfatasa alcalina y ácida, en tejidos de cuyos con tuberculosis activa (8).

Los macrófagos de diferente localización, varían -- considerablemente en su actividad bioquímica. Los macrófagos alveolares de ratas y conejos tienen niveles más altos de -- fosfatasa ácida, glucuronidasa y lisosima, que los macrófagos peritoneales. Esto último también podría depender de que el metabolismo de los macrófagos alveolares es de tipo aerobio y el de los macrófagos peritoneales es glucolítico.

Por otra parte, generalmente la resistencia a la infección se adquiere por la formación de anticuerpos específicos para cada organismo, el cual proporciona el antígeno inmunizante. El incremento en la resistencia celular es más -- efectivo para otro tipo de microorganismos, que serán combatidos por mecanismos de inmunidad celular, como es el caso -- del bacilo tuberculoso.

En relación con la transferencia pasiva de resisten-

cia celular en la tuberculosis, el suero de animales inmunizados contra M. tuberculosis no produce ningún efecto protector en animales no inmunizados.

### 3.3.- Acción de esteroides adrenales y radiaciones sobre la función de macrófagos.

Uno de los efectos básicos de los corticoides adrenales, es inhibir la actividad y disolución de lisosomas intracelulares.

Con la inoculación aérea de esporas de Aspergillus flavus en ratón, se observó que los lisosomas de macrófagos-alveolares son menos efectivos para destruir las esporas intracelulares.

Trabajos previos han demostrado una reducción de los niveles de fosfatasa ácida de macrófagos alveolares.

En 1966, Bercovici y col (98) encontraron que la radiación local in vivo e in vitro reduce el número total de Staphylococcus aureus fagocitados. En estudios realizados por Clark y Berthrong (8) en conejos infectados por vía aérea con bacilo tuberculoso y sometidos a radiación, se observó que al principio de la infección, no había cambios en las características de las células epitelioides; sin embargo, había una reducción en los linfocitos observada en frotis sanguíneos y las pruebas de sensibilidad cutánea estaban inhibidas.

Estas observaciones correlacionan muy bien con aquellas infecciones micobacterianas en donde hay evidencias de -- tratamiento anteriores a la infección, consistentes en la aplicación de radiaciones y uso de esteroides adrenales.

4.- Activación de la vía alterna del complemento por Mycobacteria y el factor cordón.

Varios componentes microbianos como el zymosan de las levaduras (Saccharomyces cerevisiae), glucanos de Streptococcus, endotoxinas lipopolisacáridas de Escherichia coli y ácidos teicoicos de paredes celulares de Streptococcus pneumoniae, se conoce que activan el sistema del complemento. Muchas fracciones de Mycobacteria, el factor cordón ( 6,6' dimicolato de tretralosa) y el dipéptido muramílico, se han probado para observar si son capaces de activar el complemento (158, 173), -- pero sóloamente el factor cordón y algunas fracciones de Mycobacteria son capaces de hacerlo. Es bien conocido que la infección con Mycobacteria produce granulomas. El posible papel -- del complemento en la producción y mantenimiento de los granulomas ha sido discutido por muchos investigadores (173). Existen muchas sustancias que son capaces de inducir una respuesta inflamatoria crónica de tipo granulomatoso y de activar el complemento produciendo la descarga enzimática de macrófagos; además, ésta puede activar el complemento y generar la produc

ción de agentes quimiotácticos para el macrófago.

Ramanathan, Curtis y Turk (98) han demostrado que todas las Mycobacteria pueden activar la vía alterna del complemento excepto la cepa BCG (cepa Pasteur), posiblemente debido a las condiciones de cultivo, que produzcan pérdida de factores que activen el complemento. Las distintas Mycobacteria -- probadas en este estudio fueron M. bovis, M. lepraemurium, -- extractos micobacterianos obtenidos de un bazo de ratón infectado con M. leprae y el factor cordón.

Se encontró que todas las suspensiones de microorganismos activaban la vía alterna del complemento, utilizando -- como fuente de este suero normal humano y sueros de cuyos deficientes en  $C_3$  y  $C_4$ .

La activación del complemento puede ser uno de los -- mecanismos por los cuales el Mycobacterium induce la formación de un proceso inflamatorio crónico, en ausencia de mediadores de la respuesta inmunitaria celular, como es el caso de la lepra lepromatosa.

##### 5.- Inmunoterapia de Cáncer experimental con Mycobacteria.

La administración de M. bovis a pacientes con cáncer o a animales con cáncer experimental, ha ocasionado toxicidad e infecciones micobacterianas sistémicas (177). Para evitar lo anterior se han utilizado Mycobacteria muertas o sus com--

ponentes, para sustituir la terapia con BCG.

Se han presentado evidencias cualitativas que indican que algunas Mycobacteria saprófitas pueden ser efectivos sustitutos del BCG en el tratamiento de algunas enfermedades malignas (167, 168, 169, 170).

E. Yarkoni y H. J. Rapp (172) presentan una comparación cuantitativa de la actividad antitumoral de cepas muertas de M. bovis, M. phlei y M. smegmatis contra un hepatocarcinoma de cuyos y de un fibrosarcoma murino (1023), además de que reportan la capacidad de estos microorganismos para producir un fenómeno de hipersensibilidad cutánea. Los resultados reportados muestran que M. phlei y M. smegmatis son efectivos, tanto como el BCG, para producir regresión tumoral, así como de producir reacciones de hipersensibilidad cutánea más fuertes que el BCG.

También se ha reportado la actividad antitumoral de paredes celulares de M. kansasii (177) y de M. smegmatis mencionando que la concentración de aceites minerales utilizados para emulsificar los componentes micobacterianos, tienen la misma actividad que las Mycobacteria. El escualeno se ha utilizado para sustituir a los aceites minerales y se ha comprobado que presenta ventajas en la inmunoterapia de cáncer debido a muchos factores; puede ser sintetizado in vitro: contiene un

solo componente, no así el aceite mineral que contienen cientos; su estructura es bien conocida y se presenta de manera normal en tejidos de muchos mamíferos. Las preparaciones micobacterianas no deben contener tween 80 debido a que éste reduce su acción antitumoral como es el caso del BCG (171).

Sin embargo, hay reportes que recomiendan que la concentración de tween 80 no debe exceder del 0.2% y establecen que a estas concentraciones, no se afecta dicho efecto.

Los resultados sugieren que las *Mycobacteria saprófitas* pueden ser útiles en el tratamiento intralesional de cáncer.

El *Mycobacterium saprofítico* difiere del BCG, en que su desarrollo es más rápido y crece en medios simples, lo que hace más adecuada la utilización de estas *Mycobacteria* para el aislamiento y caracterización de los principios antitumorales.

Recientemente se ha reportado que la combinación -- emulsificada de paredes celulares de *M. smegmatis* y factor -- cordón son útiles en la inmunoterapia del melanoma humano -- (144, 145)

## CAPITULO VI

### RESUMEN Y COMENTARIOS

Se ha establecido que existen Mycobacteria diferentes de Mycobacterium tuberculosis y Mycobacterium leprae que son patógenos importantes para el hombre.

Dos especies o complejos han aparecido como agentes predominantes de enfermedades y son: M. kansasii y el complejo M. avium-intracellulare - scrofulaceum.

La frecuencia de enfermedad por Mycobacteria no tuberculosa y los agentes etiológicos, obedecen a un patrón geográfico, hasta la fecha inexplicable, así se observa que en las ciudades de Dallas y New Orleans hay un alto índice de infecciones pulmonares causadas por M. kansasii y en el sureste de los Estados Unidos, Japón y noreste de Australia existe una predominancia de infecciones causadas por el complejo M. avium intracellulare.

Las infecciones causadas por Mycobacteria no tuberculosa involucran a una gran variedad de tejidos, especialmente el pulmón, ganglios linfáticos, piel, tejidos blandos, huesos, articulaciones y tendones del sistema esquelético.

La enfermedad generalmente se presenta en pacientes inmunosuprimidos, aunque algunas veces también se ha presentado en pacientes clínicamente sanos y sin embargo, desarro--

llan una infección diseminada. También se ha asociado a pacientes con trastornos hematológicos irreversibles.

Las condiciones predisponentes son importantes en la patogénesis de la enfermedad pulmonar y las más comunes son: - pneumoconiosis, enfermedad obstructiva crónica e infecciones - como tuberculosis que causan previo daño pulmonar.

Los mecanismos por los cuales el pulmón se infecta y el destino de la Mycobacteria, una vez inhalada, dentro del -- pulmon, todavía permanecen oscuros. Muchas de las especies de Mycobacteria potencialmente patógenas se pueden encontrar en - el medio ambiente, pero el problema a resolver es si los aerosoles son el mecanismo necesario por el cual los bacilos se -- transfieren del medio ambiente al tracto respiratorio bajo, ya que la transmisión de persona a persona generalmente no ocurre.

Sólamete se ha establecido la ruta de infección en - la formación de abscesos locales y en las infecciones que involucran a ganglios linfáticos superficiales.

El agua aparece como una importante fuente de contaminación, sobre todo en las infecciones causadas por M. marinum. M. xenopi y M. kansasii.

El diagnóstico puede ser sospechado por el clínico, - el radiólogo y el patólogo, pero es el microbiólogo el que establece la causa precisa. Como en otras áreas de la medicina - debe existir una interrelación y cooperación de todas las dis-

ciplinas para establecer un diagnóstico correcto; debido a que la contaminación de especímenes por *Mycobacteria* del medio ambiente es un hecho común. Y sólomente el aislamiento repetido de una especie del esputo, puede significar una prolongada colonización del tracto respiratorio y tener una relación con la enfermedad.

Por otra parte se requiere gran experiencia en el manejo y tratamiento del paciente con una infección micobacteriana; primero para decidir quien requiere tratamiento y segundo para determinar el régimen adecuado de drogas.

Las infecciones debidas a especies relativamente susceptibles como : *M. kansasii*, *M. marinum* y *M. xenopi* generalmente responden bien al tratamiento. Por otra parte se requieren tratamientos intensivos y prolongados con regímenes múltiples para combatir las infecciones causadas por *M. avium* - *intracelulare* - *scrofulaceum* y el complejo *M. fortuitum* - *chelonei*.

Y es en este último grupo de infecciones resistentes, donde la relación riesgo - beneficio de la terapia de drogas - debe evaluarse cuidadosamente.

Los esfuerzos futuros deben dirigirse principalmente hacia los siguientes puntos:

- 1.- El esclarecimiento de la patogénesis de la enfermedad pulmonar y de las infecciones micobacterianas en tejidos

blandos, como el granuloma de alberca y la úlcera buruli, causadas por *Mycobacteria* no tuberculosa.

2.- Dirigir las investigaciones a la obtención y uso de mejores drogas para el tratamiento de las infecciones causadas por lo complejos *M. avium - intracellulare - scrofulaceum* y *M. fortuitum-chelonei*, así como estudios controlados sobre agentes quimioterapéuticos para conocer cuales son los -- mas adecuados para la terapia de una micobacteriosis en particular.

3.- Aislamiento y caracterización química de los componentes micobacteriano que por sus propiedades tumorici-- das, puedan ser útiles en el tratamiento intralesional de cánc<sup>er</sup>.

4.- La purificación y estandarización de componentes antigénicos individuales para la realización de pruebas cutáneas, que permitan realizar diagnósticos diferenciales más -- adecuados.

5.- Investigaciones encaminadas a la elaboración de vacunas diferentes del BCG, para la protección contra enfermedades debidas a *Mycobacteria* diferente a *M. tuberculosis*.

6.- Mejor educación al microbiólogo sobre los dife-- rentes aspectos de la bacteriología de las micobacteriosis y mayores esfuerzos para lograr que el conocimiento de la *Mycobacteria* se dirija también a estudiantes de medicina, clíni--

cos y cirujanos.

Considero que este último punto es el más importante debido a que en México y a nivel de instituciones hospitalarias grandes, no se toma en cuenta el hallazgo de Mycobacteria diferente de M. tuberculosis en los especímenes clínicos, por desconocimiento del posible papel patógeno que pueda estar desempeñando.

Por otra parte, los criterios y procedimientos descritos para el diagnóstico bacteriológico y la identificación de Mycobacteria no tuberculosa son los adoptados por El Center for Disease Control (CCD). La razón de esta selección obedece a que se ha comprobado que son métodos satisfactorios para propósitos médicos y de salud pública.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adams M. Robert, Jack S. Remington. (1970) A source of Mycobacterium marinum infections resembling sporotrichosis. JAMA, -211.
- 2.- Ahn H. Chai, Lowell R. James, Davis Onstad, Emir H. Scoford, George A. Hurst. (1979) A demographic study of disease due - to Mycobacterium kansasii or Mycobacterium intracellulare -- avium in Texas. CHEST, 75-2.
- 3.- Austin W.K, Myron W. Lockey. (1976) Mycobacterium fortuitum-Mastoiditis. Arch. Otorinol., 102.
- 4.- Awe J. Robert, Pattisapu R. Gangadharam, Daniel E. Jenkins.- (1973) Clinical significance of Mycobacterium fortuitum in--fections in pulmonary disease. Am. Rev. Res. Dis., 108.
- 5.- Bacalao J. Rieber M. (1972) Ethambutol-mediated alteration - in ribonucleic acid components of Mycobacterium smegmatis. -- Journal of Bacteriology, 112.
- 6.- Baneerjee D.K., I.B. Holmes. (1976) In vitro and in vivo stu--dies of the action of rifampicin, clofazimine and B1912 on - Mycobacterium marinum. Chemotherapy, 22.
- 7.- Barbier M., E. Leder. (1954) Sur l'isolement et la constitu--tion chimique acides mycoliques de M. phlei et M. smegmatis. Biochim Biophys. Acta, 14.
- 8.- Berthrong M. (1970) The Macrophage in Tuberculosis. Advan--ces in Tuberculosis Research, 17.
- 9.- Bonicke R., Juhasz Ursula Diemer. (1970) Studies on the ni--trato reductase activity of Mycobacterium in the presence of fatty acids and related compounds. Am. Rev. Res. Dis. 102.
- 10.- Booth Jeffrey. (1979) Infection of prosthetic arthroplasty--oy Mycobacterium fortuitum. The Journal of Bone and Joint - Surgery, 61.
- 11.- Borghans G.A., J.L. Stanford. (1973) Mycobacterium chelonae in abscesses after injection of Diphtheria Pertussis, Tetanus - Polio vaccine. Am. Rev. Res. Dis, 107.

- 12.- Bradley S.G. (1972) Reassociation of deoxyribonuclei acid from selected Mycobacterium with that from Mycobacterium bovis and Mycobacterium farcinea. Am Rev. Res. Dis., 106, 122.
- 13.- Bradley S.G, J.S. Bond. (1974) Taxonomic Criteria for Mycobacteria and Nocardiae. Advances in Applied Microbiology, 18. Academic Press.
- 14.- Brennan J. Patrick, Mayer B. Goren. (1979) Structural studies on the type specific antigens and lipids of the Mycobacterium scrofulaceum serocomplex. Journal of Biological-Chemistry, 254-10.
- 15.- British Medical Research Council. Co-operative study. - - (1973). Co-operative controlled trial of a standar regimens of streptomycin, PAS, isoniacid and three alternative regimens of chemotherapy. in Britan. Tubercle, 54, 99.
- 16.- Burke S. Donald, Robert B. Ullian. (1977) Megaesophagus -- with neumonía associated with Mycobacterium chelonai. Am. Rev. Res. Dis. 116-6, 1101.
- 17.- Carson A. Loretta, Norman J. Petersen, Martin S. Favero, - Sonia M. Agüero. (1978) Grown characteristics of atypical - Mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. Applied and Enviromental Microbiology, - - 36-6, 839.
- 18.- Carrada Bravo, C. Pérez Rostro. (1970) Estudio diferencial del género Mycobacterium. Reducción del salicilato y tolerancia al ácido picrico al 1% en medio de Sauton. Rev. lat amer. Microbiol, 12-3.
- 19.- Casal Manuel. (1977) Estudio diferencial de las Mycobacteria escotocromógenas de crecimiento rápido. Rev. lat-amer. Microbiol, 19-4, 199.
- 20.- Cianciulli D. Francis. (1974) The Radish Bacillus Mycobacterium terrae-Saprophyte or Pathogen? Am. Rev. Res. Dis, - 109.
- 21.- Codias K: Elaine, Donald J. Reinhardt. (1979) Distribution of serotypes of the Mycobacterium avium intracellulare-scrofulaceum complex in Georgia. Am. Rev. Res. Dis, 119.
- 22.- Colin Ratledge. (1976) The Physiology of Mycobacteria. Advances in Microbial Physiology, 13, 116.

- 23.- Control de Tuberculosis en America Latina. Manual de Normas y Procedimientos para Programas integrados. Organización Panamericana de la Salud (1979). Publicación científica No. 376.
- 24.- Costrini A., N. D. Esopo, W. Cross, J. Hawkins. (1978) Nosocomial Infection due to Mycobacterium xenopi. Am. Rev. Res. Dis. Annual Meeting Supplement.
- 25.- Costet M., Rist N. Boisvert H. (1969) La variete africaine du bacille tuberculeux humain. Med. d Afri. Noir, 4, 321.
- 26.- Chaparas S.D. (1975) Composition of antigens of various Mycobacterial species detected with a Mycobacterium tuberculosis reference serum. Am. Rev. Res. Dis, 112, 135.
- 27.- Cheatum D.E. (1976) Chronic arthritis due to Mycobacterium intracellulare; Sacroiliac knee and carpal tunnel involvement in a young man and response to chemotherapy. Arthritis Rheum, 19, 777.
- 28.- Chusid M.J. Parrillo J.E., Fauci A.S. (1975) Chronic granulomatous disease; Diagnosis in a 27 year old man with Mycobacterium fortuitum. JAMA, 233, 1295.
- 29.- Dalovisio R. Joseph., George A. Pankey (1978) In vitro susceptibility of Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonae to amikacina. The Journal of Infectious Diseases, 137-3.
- 30.- Dalovisio R. Joseph., George A. Pankey. (1978) Problems in diagnosis and therapy of Mycobacterium fortuitum infections. Am. Rev. Res. Dis, 117, 625.
- 31.- Damle B. P., P.R. J. Gangadharam, P.F. Pratt, P.T. Davidson. (1978) In vitro activity of clofazimine against Mycobacterium intracellulare. Am. Rev. Res. Dis. Annual Meeting Supplement.
- 32.- Damsker Beca., Edward J. Bottons. (1980) Nontuberculous Mycobacteria as unsuspected agent of dermatological infections: Diagnosis through microbiological parameters. Journal of Clinical Microbiology, 11-6, 569.
- 33.- Daniel T. M., Todd L.S. (1975) The species distribution of three concanavalin A-purified Mycobacterial polysaccharides. Am. Rev. Res. Dis, 112, 361.
- 34.- Daniel T.M., (1976) Tuberculins antigens; The need for purification. Am. Rev. Res. Dis, 113, 717.

- 35.- David L. Hugo., Marie T. Jahan. (1977) Glucosidasa activity in Mycobacteria. Journal of Clinical Microbiology, 53,-383.
- 36.- David L. Hugo. (1976) Bacteriology of the Mycobacterioses.- Center for Disease Control. U.S. Department of Health, Education and Welfare.
- 37.- Davidson T. Paul. (1979) The Other Mycobacteria. CHEST, 75-2, 110.
- 38.- Davis S.D., G.W. Comstock. (1961) Mycobacterial cervical -- adenitis in children. Journal of Pediatric, 58, 771.
- 39.- Dawson D.J., E.W. Abrahams., Z.M. Blacklock. (1974) Serum - agglutinins in disease caused by Mycobacterium intracellulare. Applied Microbiology, 27-6, 1164.
- 40.- Dawson D.J., Frank Jennis. (1980) Mycobacteria with a growth requirement for ferric ammonium citrate identified as Mycobacterium haemophilum. Journal of Clinical Microbiology, -- 11-2, 190.
- 41.- Dechairo D.C., D. Kittredge. (1973) Septic arthrititis due - to Mycobacterium triviale. Am. Rev. Res. Dis, 108, 1224.
- 42.- Diaz A. Gilbert. (1974) An hemolytic streptococcus with lytic activity specific for group 111 Mycobacteria. Am. Rev.- Res. Dis, 109.
- 43.- Dresden B. Robert., Paul T. Davidson. (1976) The pathogenicity of Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonae in man. Tubercle, 57, 49.
- 44.- Edwards S. Morben., Carol J. Baker. (1978) Mycobacterium -- terrae Sinovitis and Osteomyelitis. Am. Rev. Res. Dis, 117, 161.
- 45.- Ellis Wray. (1974) Multiple bone lesions caused by Aviam Battley Mycobacteria. Journal of Bone and Joint Surgery, 56,-323.
- 46.- Elston R.H., J.P. Duffy. (1973) Mycobacterium xenopi and Mycobacterioses. Am. Rev. Res. Dis, 198.
- 47.- Faber D.R., Lasky I., Goodwin W.E. (1965) Idiopathic unilateral renal hematuria associated with atypical acid fast bacillus, Battley type. Journal of Urology. 93, 435.

- 48.- Favila L. (1975) In vitro studies of the humoral immune response of mice infected with Mycobacterium lepraemurium. -- Rev. lat-amer, Microbiol, 17, 2.
- 49.- Flowers D.J. (1970) Human infection due to Mycobacterium marinum after a dolphin bite. Journal of Clinical Pathology, - 23, 475.
- 50.- Fraser D.W., Buxton A.E., Naji A. Barker., (1975) Disseminated Mycobacterium kansasii infection presenting as cellulitis in a recipient of renal homograft. Am. Rev. Res. Dis, - 122, 125.
- 51.- Gacard Gerard., Donald Massaro. (1974) Pulmonary fibrosis - and group IV Mycobacteria infection of the lungs in ankylosing spondylitis. Am. Rev. Res. Dis, 109, 274.
- 52.- Gales P.W., Ronald R. Martins., W.E. Walker. (1974) Production of multivalent fluorescent antisera for identification of organisms in the Mycobacterium avium - Mycobacterium intracellulare complex. Applied Microbiology, 27-4, 753.
- 53.- Gangadharam P.R.M, E.R. Candler. (1977) In vitro antimycobacterial activity of some new aminoglycoside antibiotics. Tubercle, 58, 35.
- 54.- Garcia Sabater, Amador Iscla, A. Perales. (1977) Clasificación e identificación del género Mycobacterium. Rev. lat-amer. Microbiol, 19 -1, 7.
- 55.- Garcia Sabater. (1977) Diagnóstico diferencial entre Mycobacterium diernhoferi y Mycobacterium parafortuitum. Rev. - lat- amer. Microbiol, 19-2.
- 56.- Gentry R. H., Farrar W.E., Prevost A.E. (1977) Simultaneous infection of the central nervous system with Criptococcus neoformans and Mycobacterium intracellulare. South Med. -- J., 70, 865.
- 57.- Goslee S.T. Rynearson, E. Wolinsky. (1976) Additional serotypes of Mycobacterium scrofulaceum, Mycobacterium gordonae, Mycobacterium marinum and Mycobacterium xenopi determined by agglutination. Int. J. Syst Bacteriol, 26, 136.
- 58.- Good C. Good. (1979) Nontuberculous Mycobacteria. Clinical - Microbiology Newsletter, 1-20, 1.

- 59.- Graybill R. John., Silva Joseph., Fraser W. David., Robert-London, Edna Rogers. (1974) Disseminated Mycobacteriosis -- due to Mycobacterium abcessus in two recipients of renal homografts. Am. Rev. Res. Dis, 109, 4.
- 60.- Gruft Howard, Arthur Loder, Mary Osterhout, Bruce C. Parker, Joseph O. Falkinham. (1979) Postulated sources and Mycobacterium scrofulaceum infection; Isolation of Mycobacteria -- from estuaries and ocean waters. Am. Rev. Dis, 120.
- 61.- Gunthorpe W.J., Stanford J.L. (1972) A study of Mycobacterium gordonae and Mycobacterium marianum (scrofulaceum) - Br. J. Exp. Pathol, 53, 665.
- 62.- Gutman L.T., Handwerger P. Zwadyk. (1974) Thyroiditis due - to Mycobacterium chelonae. Am. Rev. Res. Dis, 110-6, 807.
- 63.- Hawkins E. Jean. (1977) Scotochromogenic Mycobacteria which appear intermediate between Mycobacterium avium intracellulare and Mycobacterium scrofulaceum. Am. Rev. Res. Dis, 116, 963.
- 64.- Hepper N.G., G. Karlson, A.G. Leary, F.J. Soule. (1971) Genitourinary infection due to Mycobacterium kansasii. Mayo, - Clin. Proc, 46, 387.
- 65.- Herman R. Peter, Morton M. Weber. (1980) Isoniazid interaction with tyrosine as a possible mode of action of the drug in Mycobacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, -- 17-2, 170.
- 66.- Herrod G. Henry, M. Henderson Rourke, Alexander Spock. (1979) Pulmonary disease in children caused by nontuberculous Mycobacteria. The Journal of Pediatrics, 94-6, 915.
- 67.- Hirsh S. Fred. Oscar E. Saffold. (1976) Mycobacterium kansasii infection with dermatologic manifestation. Arch Dermatol, 112.
- 68.- Institute for Tropical Medicine. (1978) DMSO (dimethylsulfoxide) resensibilization as potential chemotherapy for opportunistic mycobacterial disease. Am. Rev. Res. Dis, 118, -- 969. Publicación científica No. B-2000.
- 69.- Isselbacher J.K., R.D. Adams, E. Braunnewald, R.G. Petersdorf. J.D. Wilson. (1981) Principles of Internal Medicine.- Ninth Edition. Mc. Graw Hill Company.

- 70.- Jenkins P.A., J. Marks, W.B. Schaefer. (1971) Lipid chromatography and seroagglutination in the classification of rapidly growing mycobacteria. *Am. Rev. Res. Dis*, 103, 179.
- 71.- Jenkins P.A., J. Marks, W.B. Schaefer. (1972) Thin layer -- chromatography of mycobacterial lipids as an aid to classification, the scotochromogenic mycobacteria, including Mycobacterium scrofulaceum, Mycobacterium xenopi, Mycobacterium aquae, Mycobacterium gordonae and Mycobacterium flavescens. *Tubercle* 53, 118.
- 72.- Kim Robert. (1974) Tetracycline therapy for atypical mycobacterial franuloma. *Arch. Dermatol*, 110, 299.
- 73.- Klotz P.G. (1970) Atypical acid fast bacteria in urine. *Can. Med. Assoc. J.* 103, 283.
- 74.- Koneman, Allen, Dowell, Somers. (1979) Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology. Edited by Lippincott Company.
- 75.- Kozinn P. Wesley, Beca Damsker, Edward J. Bottone. (1980) - Mycobacterium avium complex significance of isolation from-bone marrow culture. *Jornal of Clinical Microbiology*, 11-3.
- 76.- Krieg E. Richard, Mayne T. Hockmeyer, Daniel H. Connor. - - (1974) Toxin of Mycobacterium ulcerans. Production and - - effects in guinea pig skin. *Arch Dermatol*, 110,783.
- 77.- Kubica F.P. (1973) Differential identification of Mycobacteria. VII key features for identification of clinically significant Mycobacteria. *Am. Rev. Res. Dis*, 107, 9.
- 78.- Landau William, Joseph Fecako, Raymond L. Kaplan. (1980) Radiometric detection of Mycobacteria in routine blood culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 12-3, 477.
- 79.- Leroy W. Lee, Louis W. Burher, Edward B. Price. (1977) Granulomatus Prostatitis. *JAMA*, 237-22.
- 80.- Manes L. José, Olga M. Blair. (1976) Disseminated Mycobacterium kansasii infection complicating hairy cell leukemia. *JAMA*, 236, 1878.
- 81.- MacDonald Mary K., R. Passmore., J.S. Robson. (1974) A companion to medical studies. Blackwell Scientific Publications.

- 82.- Marmostein L. Barry, David J. Scheinhorn. (1975) The role - of nontuberculous mycobacterial skin test antigens in the - diagnosis of mycobacterial infections. CHEST, 67,3.
- 83.- Marks J., Palfreyman J.M., W.B. Schaefer. (1977) A diffe--rential tuberculins test for mycobacterial infection in - - children. Tubercle, 58,19.
- 84.- Marks J.P., P.A. Jenkins, M. Tsukamura. (1972) M. szulgai - a new pathogen. Tubercle, 53,210.
- 85.- Meissner Gertrud, Karl Heinz Schöder. (1975). Relationship between Mycobacterium simiae and Mycobacterium habana. Am. Rev. Res. Dis, 111.
- 86.- Meissner Gertrud, Wolfgang Anz. (1977) Sources of Mycobac--terium avium complex infection resulting in human disease.- Am. Rev. Res. Dis, 116, 1057.
- 87.- Morimoto G. Monique, Anne G. Rothrockand, K.D. Stolttmeier. (1974) Isolation of acid fast organisms from surgical speci--mens. Journal of Clinical Microbiology, 10,40.
- 88.- Nogueira M. Victor, G. Carvajal. (1968) Nota preliminar so--bre la diferenciación bioquímica entre Mycobacterium bovis- y otras Mycobacteria. Rev. lat-amer Microbiol, 10-1, 1.
- 89.- Newman H. (1970) Renal disease associated with atypical --mycobacteria. Battey type. Jornal of Urology, 103, 403.
- 90.- Oatway H. Williams. (1979) Incidence of atypical Mycobacte--ria in Los Angeles Country and California. Am. Rev. Res. --Dis, 120, 1389.
- 91.- Ortbals W. David, Joseph Marr. (1978) A comparative study - of tuberculous and other mycobacterial infections and their associations with malignancy. Am. Rev. Res. Dis, 117.
- 92.- Ortiz Ortiz L., Rivas Gómez C., Bojalil L.F. (1971). Tuber--culin activity of somatic fractions obtained from Mycobacte--rium. Rev. lat-amer. Microbiol, 13-1.
- 93.- Ostenson R.C., S.H. Bates. (1978) In vitro drug interations with Mycobacterium intracellulare. Am. Rev. Res. Dis, - - Annual Meeting Supplement.
- 94.- Even Paz Z., Haas H. Sacks, E. Rosenmann. (1976) Mycobacte--rium marinum skin infection mimicking cuta neous leishma--niasis. Br. J. Dermatol, 94, 435.

- 95.- Pergament M., Ricardo González, Elwin E. Fraley. (1974) Atypical Mycobacteriosis of the urinary tract. JAMA, 229-7.
- 96.- Pratt F. Philip, R. Pattisapu Gangadharam, Pradeep B. Damle. (1978) A new lead to effective control of the refractory -- Mycobacterium intracellulare. Am. Rev. Res. Dis, Annual Meeting Supplement.
- 97.- Portaels Françoise. (1978) Difficulties encountered in identification of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum and related strains. Am. -- Rev. Res. Dis, 118.
- 98.- Ramanathan V.D., Jill Cortis, John L. Turk. (1980) Activation of the alternative pathway of the complement by Mycobacteria and Cord Factor. Infection and Immunity, 29-1.
- 99.- Rauscher R. Clifford, Gerald Kerby, William E. Ruth. (1974) A ten clinical experience with Mycobacterium kansasii. -- CHEST, 66,1.
- 100.- Reiner E.R., G.P. Kubica. (1969) Pyrolysis gas-liquid-chromatography studies for the classification of Mycobacteria.- Am. Rev. Res. Dis, 99, 570.
- 101.- Reiner E.R., J.J. Hickes., R.E. Beam., H.L. David. (1971) - Recent studies on mycobacterial differentiation by means of pyrolysis gas liquid chromatography. Am. Rev. Res. Dis, -- 104, 656.
- 102.- Richard Marks, Kenrad E. Nelson., Murray D. Batt. (1979) Tuberculin test conversion during repeated skin testing associated with sensitivity to non tuberculous Mycobacteria. - Am. Rev. Res. Dis, 120-59-65.
- 103.- Rohde A. Paul. (1974) Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos. Becton Dickinson and Company.
- 104.- Rojas Espinosa Oscar. (1976) Informe sobre el efecto de la vacunación con BCG en la protección contra otras enfermedades micobacterianas. Rev, lat-amer. Microbiol, 18-1.
- 105.- Rosenzweig Y. David. (1979) Pulmonary Mycobacterial Infections due to Mycobacterium intracellulare - avium complex.- Clinical features and course in 100 consecutive cases. CHEST 75-2, 115-119.

- 106.- Rourke M.F., Shanahan M.X., J.L. Harkness. (1978) Endocarditis with an acid fast organism after porcine heart valve replacement. Lancet. Sep. 23, 686.
- 107.- Runyon H. Ernest, A.G. Karlson, George P. Kubica, Lawrence G. Wayne. (1974) Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Second Edition.
- 108.- Runyon H. Ernest., Thomas M. Dietz. (1971) Skin sensitivity induced by Group 11 Mycobacteria. Am. Rev. Res. Dis, - 104.
- 109.- Runyon H. Ernest. (1974) Ten Mycobacterial Pathogens. Tubercle, 55, 235-240.
- 110.- Ruy Perez Tamayo. (1965) Principios de Patología. Prensa Médica Mexicana. Segunda edición.
- 111.- Saito Hajime, Hiromichi Tasaka, Shosaburo Osasa. (1974) -- Disseminated Mycobacterium intracellulare infection. Am.- Rev. Res. Dis, 109, 572-576.
- 112.- Saito Hajime, Takashi Watanabe, Haruaki Tomioka. (1979) Purification, properties and cytotoxic effect of a bacteriocin from Mycobacterium smegmatis. Antimicrobial agents and Chemotherapy, 15-4, 504-509.
- 113.- Saito Hajime, Hideo Masai. (1980) New heat stable acid - - phosphatase test for differentiation of Mycobacterium. -- Journal of Clinical Microbiology, 2-1.
- 114.- Sanders W. Eugene, Jr. Eldert C. (1977) Susceptibility of organism in the Mycobacterium fortuitum complex to antituberculous and other antimicrobial agents. Antimicrobial agents and Chemotherapy, 12-2, 295, 297.
- 115.- Sanders J. Williams. Emanuel Wolinsky. (1980) In vitro -- susceptibility of Mycobacterium marinum to eight antimicrobial agents. Antimicrobial agents and Chemotherapy, 18-4,- 529-531.
- 116.- Schaad B. Urs, Theodore P. Votteler, George H. Gracken. -- (1979) Management of atypical Mycobacterial lymphadenitis in childhood: A review bases on 380 cases. The Journal of Pediatrics, 95-3, 356-360.

- 117.- Shepard C. Charles, Rosalind Van Landingham, Laura L. Walker. (1980) Searches among Mycobacterial culture for anti leprosy vaccines. Infection and Immunity, 29-3, 1034-1939.
- 118.- Smith D.W., H.M. Randall. A.P. Mac Lennan., R.K. Putney. - (1960) Detection of specific lipids in mycobacteria by infrared spectroscopy. Am. Rev. Tuberc, 79, 217-229.
- 119.- Snow G.A. (1970) Mycobactins; iron chelating growth factors from Mycobacteria. Bacteriological Reviews, 34, 99--125.
- 120.- Sodeman A. Williams, Sodeman M. Thomas. (1979) Pathologic-Physiology Mechanism of Disease. W.B. Saunders Company - - First Edition.
- 121.- Solarolo B.E., C. Larralde., L.F. Bojalil (1969) Fracciones de micobacterias con actividad inflamatoria especifica e inespecifica, inmediata y retardada. Rev. lat-amer, Microbiol, 11-1.
- 122.- Sompolinsky D., A. Lagziel., D. Naveh., T. Yankilevitz. -- (1978) Mycobacterium haemophilum sp. nov. a new pathogen - for humans. Int. J. Syst. Bacteriol, 28, 67-75.
- 123.- Sompolinsky D., A. Lagziel., I. Rosenberg. (1979) Further studies of a new pathogenic Mycobacterium (M. haemophilum-sp. nov.) Can. J. Microbiol, 25, 217-226.
- 124.- Stanford J.L. (1973) An immunodiffusion analysis of strain of Mycobacterium ulcerans isolated in Australia, Malaya, - México, Uganda y Zaire. J. Med Microbiol, 6, 405-408.
- 125.- Steadham E. Joseph. (1980) High catalasa strain of Mycobacterium kansasii: Isolate from water in Texas. Journal of - Clinical Microbiology, 11-5.
- 126.- Steadham E. Joseph. (1979). Reliable urease test for identification of Mycobacterium. Journal of Clinical Microbiology, 10-2, 134-137.
- 127.- Steere Allen C., Josefino Corrales. Alexander Von Graevenitz. (1979) A cluster of Mycobacterium gordonae isolated from bronchoscopy specimens. Am. Rev. Res. Dis, 120, 214-216.
- 128.- Stedman's Medical Dictionary. (1972) The Williams Wilkins-Company. Baltimore. 22nd Edition.

- 129.- Stottmeier K.D., L. Tose., C. Jones. (1973) Clinical and -- bacteriologic evaluation of pulmonary mycobacteriosis in - the greater Boston area. *Am. Rev. Dis*, 168, 1227-1230.
- 130.- Sutker L. Williams, L. Lee Lankford., Ralph Tompsett.(1979) Granulomatous synovitis: The role of atypical Mycobacteria. *Reviews of Infections Diseases*, 1-5, 729-735.
- 131.- Takayama K., Emma L. Armstrong., Keith A. Kunugi., James O. Kilburn. (1979) Inhibition by Ethambutol of mycolic acid - transfer into the cell wall of Mycobacterium smegmatis. - Antimicrobial agents and Chemotherapy, 12-2, 240-242.
- 132.- Tellis J. Claude, Cash R. Beechler, David K. Ohashi y Sarah A. Fuller. (1977) Pulmonary disease caused by Mycobacterium xenopi. *Am. Rev. Res. Dis*, 116, 779-783.
- 133.- Tice D. Alan, Richard J. Solomons. (1979) Disseminated -- Mycobacterium chelonae infection: response to sulfonamides. *Am. Rev. Res. Dis*, 12), 197-201.
- 134.- Tinsdal A. Philip, Glenn D. Roberts, John P. Anhalt.(1979) Identification of Clinical isolates of Mycobacteria with - Gas-Liquid Chromatography. *Journal of Clinical Microbiology*, 10-4, 506-514.
- 135.- Thoen C., E.M. Himes., J.L. Jarnagin., R. Harrington.(1979) Comparison of four culture media for isolation of Mycobacterium avium complex from porcine tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, 19-2, 194-196.
- 136.- Tsukamura Michio, Shoji Mizuno, Sumio Tsukamura. (1969) Numerical classification of slowly growing Mycobacteria. *Am. Rev. Res. Dis*, 99, 299-303.
- 137.- Tsukamura M., E. Nakamura., I. Kurita., T. Nakamura.(1973). Isolation of Mycobacterium chelonae (Mycobacterium borstelense) from pulmonary lesions of nine patients. *Am. Rev. - Res. Dis*, 108, 683-685.
- 138.- Tsukamura Michio.(1973) Background factors for casual isolation of Mycobacterium intracellulare from sputum of patients with tuberculosis. *Am. Rev. Res. Dis*, 108, 679-683.
- 139.- Valdivia Alvarez, J.A. Suárez Méndez, R. Echemendia Font - M. (1971) Probable nueva especie dentro de las Mycobacterias no clasificadas. *Bol. Higiene Epidemiol*, 9, 65.

- 140.- Valdivia Alvarez. (1973) Mycobacterium habana. Clinical and epidemiological significance. Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 53, 263-269.
- 141.- Vakilzadeh J., Vandiviere H.M., I.G. Willis, (1968) New aspects of Mycobacterial skin test. Arch Environ. Health, 16, 892.
- 142.- Van Dyke John, Kevin B. Lake. (1975) Chemotherapy for Aquarium Granuloma. JAMA, 233-13, 1380-1381.
- 143.- Van Zeben W. (1965) Cervical lymph node tuberculosis caused by atypical Mycobacteria. Clin Pediatric, 4, 320.
- 144.- Vosika G.J., R. Schmi Atke., A. Goldman., E. Ribi., R. Parker., G.R. Gray. (1979) Intralesional immunotherapy of malignant melanoma with M. smegmatis cell wall skeleton combined with trehalosa dimycolate (P<sub>3</sub>). Cáncer, 44,495-503.
- 145.- Vosika G.J., J. Schmidtke, A. Goldman., R. Parker., E. Ribi., G.R. Gray. (1979) Phase I-II study of intralesional immunotherapy with oil attached M. smegmatis cell wall skeleton and trehalosa dimycolate. Cancer Immunol. Immunother. 6, 135-142.
- 146.- Wallace Richard, Dalovisio R. Joseph. (1979) Disk diffusion testing of susceptibility of Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonae to antibacterial agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 16-5, 611-614.
- 147.- Ward P.A. (1979) Mediators of inflammatory responses. Mechanism of Immunopathology. Edited by S. Cohen and P.A. Ward. John Wiley & Sons N.Y. First Edition. Pages 1-12.
- 148.- Ward J.M. (1975) Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonae fast growing Mycobacteria. Br. J. Dermatol. 92, - 453.
- 149.- Warring F.C. (1968) Mycobacteria in a New England Hospital: A study of mycobacterial species occurring in the sputum of patients with chronic pulmonary disease. Am. Rev. Res. Dis, 98, 965.
- 150.- Watanakunakorn C., Trott A. (1973) Vertebral osteomyelitis due to Mycobacterium kansasii. Am. Rev. Res. Dis, 107, 846.

- 151.- Wayne L.G., I. Krassnow (1966) Preparation of tuberculosis susceptibility testing medium by means of impregnated disc. Amer. J. Clin. Pathol. 45, 769, 771.
- 152.- Wayne L.G. (1971) Phenol soluble antigens from M. kansasii, M. gastri and M. marinum. Infect Immunol. 3, 36.
- 153.- Wayne L.G., L. Andrade, S. Froman., W. Kappler, E. Kubala, Gertrud Meissner., Michio Tsukamura. (1978) A cooperative-numerical analysis of Mycobacterium gastri, Mycobacterium kansasii and Mycobacterium marinum. Journal of General Microbiology. 109-11, 319-327.
- 154.- Weiszfeiler J.G., E. Karczag (1971) Synonymy of M. siniae-Karasseva (1965) and M. habana Valdivia (1971). Int. J. -- Syst. Bacteriol. 26, 474.
- 155.- Welch F. David. (1979) Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium fortuitum complex. Antimicrobial -- agents and Chemotherapy. 15-6, 754-757.
- 156.- Wijsmuller G., Bardine A.L. (1972) A method of characterizing tuberculins. Am. Rev. Res. Dis. 105, 736.
- 157.- Williams C.S., Riordan D.C. (1973) Mycobacterium marinum - (atypical acid fast bacillus) Infections of the hand. Report of six cases. J. Bone Joint Surg. 55, 1042.
- 158.- Winkelstein J.A., A. Tomasz. (1978) Activation of the alternative pathway by pneumococcal cell wall teichoic acid. J.- Immunol. 120, 174-178.
- 159.- Winter F.E., Runyon E.H. (1965) Prepatellar bursitis caused by Mycobacterium marinum. J. Bone. Surg Am. 47, 375.
- 160.- Wolinsky E., W.B. Schaefer (1973) Proposed numbering scheme for mycobacterial serotypes by agglutination. Int. J. - Syst. Bacteriol, 23, 182-183.
- 161.- Wolinsky E., Gómez F., Zimpfer F. (1976) Sporotrichoid -- Mycobacterium marinum infection treated with rifampicin -- ethambutol. Am. Rev. Res. Dis, 105, 964.
- 162.- Wolinsky E. (1979) Nontuberculous Mycobacteria and associated diseases. Am. Rev. Res. Dis, 119, 107-159.
- 163.- Yaoi H. Takei., Tsuji M. (1957) Biological studies on Mycobacterium ulcerans on catalasa activity. Jap. J. Microbiol. 1, 79.

- 164.- Yaoi H. Takei., Tsuji M. (1957) Biological studies on Mycobacterium ulcerans (Mac Calum). Outline of the characteristics. Jap. J. Microbiol. 1, 29.
- 165.- Yamamoto M. Sudo., K. Taga M., Hibino S. (1967) A study of diseases caused by atypical Mycobacteria in Japan. Am. Rev. Res. Dis. 96, 779.
- 166.- Yarkoni E., Meltzoe M.S., H.J. Rapp. (1977) Tumor regression after intralesional injection of emulsified trehalosa -6,6' dimycolato (Cord Factor); Efficacy increases with oil concentration. Int J. Cancer. 19, 818-821.
- 167.- Yarkoni E., H.J. Rapp., B. Zbar. (1977) Immunotherapy of a guinea pig hepatoma with ultrasonically prepared mycobacterial vaccines. Cancer Immunol. Immunother. 2, 143-146.
- 168.- Yarkoni E., H.J. Rapp. (1976) Immunotherapy of guinea pig-- with a transplanted hepatoma; comparison of intralesionally administered killed BCG cells and BCG cell wall. Infect Immun. 25, 1087-1089.
- 169.- Yarkoni E., H.J. Rapp. (1979) Tumor regression after intralesional injection of mycobacterial components emulsified - in 2,6,10,15,19,23, hexamethyl - 2,6 - 10,14,18,22 tetracosahexane (Squalene), 2,6,10,15,19,23 - hexamethyl tetracosane (Squalene), peanut oil or mineral oil. Cancer Res. 39, 1518-1520.
- 170.- Yarkoni E., H.J. Rapp (1979) Influence of oil concentration on the efficacy of tumor regression by emulsified components of Mycobacteria. Cancer Res. 39, 535-537.
- 171.- Yarkoni E. H.J. Rapp. (1980) Influence of type of oil and - surfactant concentration on the efficacy of emulsified Mycobacterium bovis BCG cell walls to induce tumor regression - in guinea pigs. Infect-immun. 28-3, 881-886.
- 172.- Yarkoni E. H.J. Rapp. (1980) Immunotherapy of experimental-cancer by intralesional injection of emulsified nonliving - Mycobacteria; Comparison of M. bovis, M. phlei. M. smegmatis. Infect - immun. 28-3, 887-892.
- 173.- Yeager Henry., James W. Raleigh. (1973) Pulmonary disease - due to Mycobacterium intracellulare. Am. Rev. Res. Dis, -- 108, 547-552.
- 174.- Yoder W.D., W.B. Schaefer. (1971) Comparison of the seroagglutination test with the pathogenicity test in the chicken

for the identification of M. avium and M. intracellulare.  
Am. Rev. Res. Dis, 103, 173.

- 175.- Youmans G.P., Parlett R.C., Youmans A.S. (1961) The significance of the response of mice to immunization with viable unclassified Mycobacteria. Am. Rev. Res. Dis. 83,903.
- 176.- Zack M.B., Fulkerson L., Hartshorne L., G. Kennedy. (1973) Clinical evaluation of stabilized and nonstabilized PPD-B- in patients with Group 111 Atypical Mycobacteria. Chest.- 63,348.
- 177.- Zbar B.E., T. Meyers., E. Ribl., I. Azuma. (1974) Immuno-- therapy of cancer regression of established intradermal tumors after intralesional injection of mycobacterial cell - walls attached to oil droplets. J. Natl. Cancer Inst. 52.- 1571-1577.
- 178.- Zeligman Israel. (1972) Mycobacterium marinum Granuloma. - Arch Dermatol. 106.
- 179.- Zettergren. L., Zettergren B. (1956) The swimming pool disease (Mycobacteriosis balnearea). Acta Soc. Med. Upsal, - 61,47.
- 180.- Ziefer AnneMarie., D.H. Connor., Dean W. Gybson. (1981) In fection of two patients in Liberia. Int. J. Dermatol. 20,- 362-367.

A P E N D I C E A.Medios de cultivo utilizados en el aislamiento de Mycobacteria.1.- Medio de Lowenstein - Jensen.Fórmula: (en gramos por 600 ml de agua destilada).

Fosfato monopotásico .....	2.5
Sulfato de magnesio .....	0.24
Citrato de magnesio .....	0.60
Asparagina .....	3.0
Harina de papa .....	30.0
Verde de malaquita .....	0.40

2.- Agar de Middlebrook y Cohn 7H10.Fórmula: (en gramos por 900 de agua destilada).

Sulfato de magnesio .....	0.050
Citrato de hierro y amonio .....	0.040
Citrato de sodio .....	0.40
Sulfato de amonio .....	0.50
Glutamato monosódico.....	0.50
Fosfato de sodio .....	1.5
Fosfato monopotásico.....	1.5
Agar desecado .....	13.5
Piridoxina .....	0.001
Sulfato de zinc .....	0.001
Sulfato de cobre .....	0.001

Biotina ..... 0.500 mg.

Cloruro de Calcio ..... 0.500

Verde de malaquita..... 0.250

pH final 6.6

También se puede añadir dextroxa al 50%, cuatro ml.- y 100 ml de complejo albúmina - oleíco (Dubos), 3 ml de solución de catalasa de 1 mg / ml. Los cultivos se incuban a 35°C en atmósfera de CO<sub>2</sub>.

### 3.- Caldo de Middlebrook 7H9.

Fórmula: ( en gramos por 900 ml de agua destilada).

Fosfato monopotásico ..... 1.0

Fosfato disódico ..... 2.5

Acido L-glutámico ..... 0.5

Citrato de sodio ..... 0.1

Sulfato de amonio ..... 0.5

Piridoxina ..... 0.001

Citrato de hierro y amonio ..... 0.040

Sulfato de magnesio ..... 0.050

Sulfato de zinc ..... 0.001

Sulfato de cobre ..... 0.001

Biotina ..... 0.5mg

Cloruro de calcio ..... 0.5mg

pH final 6.6

Se añade glicerina 2 ml, 0.5 ml de polisorbato 80 - - (tween 80) y 2 g de dextrosa, para obtener un medio sólido aña da 15 g de agar y 1 mg de verde de malaquita. A 45°C se añade el enriquecimiento ADC de Middlebrook aproximadamente 20 ml.

4.- Agar con ácido oléico de Dubos.

Fórmula: (en gramos por litro de agua destilada).

Peptona trypticase .....	0.05
Asparagina .....	1.00
Fosfato monopotásico.....	1.00
Fosfato disódico .....	2.50
Citrato de amonio férrico .....	0.05
Sulfato de magnesio .....	0.01
Agar .....	15.0
Cloruro de calcio .....	0.05mg
Sulfato de zinc .....	0.10mg
Sulfato de cobre .....	0.10mg
pH final 6.6	

Después de esterilizar, se añade el enriquecedor en-- friando a 50°C. El enriquecedor puede ser:

a.- Solución de albúmina. Se disuelven 5 g de la fra-- cción V del plasma de bovino en 100 ml de solución salina al - 0.85%, se filtra y se calienta a 50° C y de ella se agregan -- asépticamente 20 ml. a 180 ml de la base de agar.

b.- Complejo ácido oléico - albumina. Se disuelven 0.12 ml. de ácido oléico en 10 ml. de NaOH N/20. De esta solución se agregan 5 ml. a 95 ml. de una solución salina de la fracción V de albumina ( solución anterior ). La mezcla se calienta a 55° C, durante 30' y se esteriliza por filtración. De esta solución se agregan asépticamente 20 ml. a 180 ml de la base de agar.

c.- Suero estéril. En un lugar de la albúmina se pueden agregar 20 ml. de suero estéril calentado a 50° C.

d.- Ester polisorbato. Se añade a la base de agar antes de esterilizar en autoclave, en una concentración de 0.5 o 0.1%.

e.- Penicilina. Para aislar al bacilo tuberculoso se añaden de 5000 a 10000 unidades de penicilina a cada 200 ml. de medio en forma aséptica.

f.- Glicerina. Antes de esterilizar la base se le puede añadir de 1.0 a 5.0% de glicerina o 1.0% de glucosa.

g.- Carbón vegetal.- Para hacer el medio de Hish estable, a cada litro de la formulación dada se le añade antes de esterilizar, 1 g. de carbón vegetal ( norita ), y 25 ml. de una solución de colesterol al 1% en acetona junto con 1% de glicerina.

A P E N D I C E B.Procedimientos de laboratorio utilizados en el diagnóstico.1.- Colección y Manejo de Especímenes Clínicos.

Espujo. Se debe instruir al paciente sobre la necesidad de que la muestra provenga de los bronquios o de lo más profundo del pulmón. La saliva o secreciones nasales no son satisfactorias para el estudio.

El paciente puede enjuagarse la boca con agua, pero no debe utilizar desinfectantes, ni realizar enjuagues repetidos.

El recipiente de recolección debe ser estéril, de -- plástico ó vidrio y cerrar perfectamente.

El espécimen debe colectarse en la mañana, debiéndose desechar especímenes retenidos.

Volúmenes de 5.0 a 10.0 ml. son adecuados, aunque -- muestras menores deben también procesarse.

Si el espécimen no pudo ser trabajado debe refrigerarse, y si está siendo enviado no debe exceder de 5 días y -- debe mantenerse en refrigeración.

Espujo Inducido.: Debido a que existen pacientes que no saben expectorar, se induce la expectoración mediante el -- uso de aerosoles calientes, que contienen soluciones acuosas de NaCl al 10%.

Actualmente, ya existen nebulizadores comerciales para este propósito. Los nebulizadores ultrasónicos también son utilizados. Lo mismo que los aparatos para la detección de células cancerígenas aunque el uso de propilén glicol no se recomienda ( 74 ).

Orina: Se colecta la micción intermedia de la primera orina de la mañana. Los especímenes de más de 24 horas se deben desechar.

La orina también se puede colectar por catéteres en los ureteres, hay que recordar que la orina es un excelente medio de cultivo para los microorganismos y aunque la muestra se tome asépticamente, es un espécimen fácil de contaminar.

Cuando no hay posibilidades de que la muestra sea -- procesada inmediatamente, es necesario mantenerla en refrigeración.

Tejidos: Colectar el espécimen asépticamente y colocarlo en un recipiente apropiado. No es adecuado añadir fijadores ni conservadores, tales como formol.

Si el espécimen tiene que ser transportado hasta un laboratorio o centro de diagnóstico; es preferible mantenerlo congelado.

Pus.: El pus de absesos, empiemas y adenitis, debe ser enviado inmediatamente al laboratorio.

Otros tipos de especímenes: líquido cerebroespinal, -  
fluidos de cavidades serosas como: pleura, pericardio y cavida  
des sinoviales deben procesarse de inmediato. Lo mismo se apli  
ca a sangre menstrual y mucosa uterina obtenidos por curación.

## 2.- Procedimientos de Laboratorio para Microscopía.

Preparación de Frotis.- Para realizar un frotis direc  
to, se toma de las partes más gruesas del material caseoso y -  
de la parte más densa del material purulento; debido a que en  
estas zonas es más común encontrar Mycobacteria.

El material se esparce a través del portaobjetos, tra  
tando de dejar una capa gruesa ( frotis grueso ).

Los portaobjetos utilizados deben ser nuevos ya que -  
los usados anteriormente pueden tener bacterias ácido-alcohol-  
resistentes.

Para realizar frotis por concentración, el sedimento-  
de un espécimen homogeneizado, se coloca por medio de una pipeta  
o asa en el centro del portaobjetos extendiéndose y dejando  
una capa gruesa del material.

Para fijar el frotis se calienta sobre la flama de un  
mechero, pasándolo tres veces sobre el cono más caliente de la  
flama; un procedimiento alternativo puede ser el calentar los  
frotis sobre una platina caliente por 2 hrs. a 65° C-70° C.

### Procedimientos de Teñido.

#### Tinción de Ziehl - Neelsen.

**Reactivos:**

Se disuelven 0.3 g de fuchina básica (magenta) en -- 10.0 ml. de etanol al 90%, anadiéndose una solución acuosa de fenol al 5%.

Alcohol - Acido: lentamente se añade 3.0 ml. de ácido clorhídrico concentrado, a 97 ml. de etanol al 90% - 95%.

Colorante de contraste: Se disuelven 0.3 g de cloruro de azul de metileno en 100 ml. de agua destilada.

**Procedimiento:** Se cubre el frotis fijado por calor -- con un pequeño rectángulo de papel filtro ( 2.0 x 3.0 cm ).

Se aplican aproximadamente 5 gotas de carbo-fuschina- de manera de cubrir totalmente el papel filtro.

Se calienta a vapor por 5 min. tratando de que el frotis no se seque y si se seca, aplicar más colorante.

Remover el papel con pinzas. Lavar el frotis con agua hasta eliminar el colorante.

Decolorar con alcohol - ácido hasta que no salga más- colorante en los lavados.

Contraste con azul de metileno ( 1 - 2 min. ).

Secar al aire. No calentar.

**Procedimiento de Kinyoun.****Reactivos: Carbo- fuchina de Kinyoun.**

Se disuelven 4.0 g de fuchina básica (magenta) en 20 -

ml. de etanol al 90.0 - 95% y se añade 100 ml. de una solución acuosa de fenol al 9%.

El alcohol - ácido y el azul de metileno se preparan como en la tinción de Ziehl - Neelsen.

El procedimiento es el indicado en la técnica de Ziehl Neelsen pero no hay calentamiento y la carbo-fuchsina se aplica por 5 min.

#### Tinción Fluorescente con Auramina.

Reactivos: Auramina fenolada.

Se disuelve 0.1 g. de auramina O en 100 ml. de etanol al 90.0% - 95% y se añade una solución de 3 g. de fenol en 87.0 ml. de agua destilada. La solución debe conservarse en frasco ámbar. Alcohol ácido: se añaden 0.5 ml. de ácido clorhídrico a 100 ml. de etanol al 70%.

Solución de permanganato de potasio: Disolver 0.5 g. de permanganato de potasio en 100 ml. de agua destilada.

#### Procedimiento:

Cubrir el frotis previamente fijado con calor, con -- carbo-auramina y teñir durante 15 min. No usar papel filtro ni calor.

Lavar con agua y secar.

Contrastar con permanganato de potasio por 2 min.

Lavar y secar al aire. No calentar.

El permanganto de potasio no es un verdadero colorante de contraste, pero evita la fluorescencia del fondo.

Tinción con Auramina O - A naranjado de Acridina. --  
Fluorescente para bacilos ácido resistentes.

Reactivos: Auramina fenolada, se prepara de la manera arriba indicada.

Alcohol-ácido, se prepara de la manera arriba indicada.

Colorante de contraste: 0.01 g de anaranjado de acridina en 100 ml. de una solución acuosa al 1% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

Procedimiento: Se procede igual que la tinción anterior únicamente que el anaranjado de acridina sustituye al permanganato de potasio. El anaranjado de acridina imparte al fondo una fluorescencia de color roja a naranja.

Exámen de los frotis.

Al examinar los frotis teñidos con carbo-fuschsina + en un microscopio de luz transmitida con objetivo de inmersión ( 100 x ), los bacilos se tiñen de rojo y el fondo de azul.

En un microscopio de fluorescencia, los frotis, teñidos con Auramina O muestran a los bacilos dorados o de un color amarillo brillante, siendo el fondo negro. Es necesario no utilizar portaobjetos de vidrio fluorescente.

Clasificación de Frotis.

La Asociación Nacional de Tuberculosis de los EE. UU

(36) recomienda la siguiente clasificación:

<u>No. de Bacilos.</u>	<u>Reporte.</u>
0	No se encontraron bacilos. ácido alcohol resistentes.
1-2 en todo el frotis	Se reporta el No. y se repite el estudio.
3-9 en todo el frotis	Escasos ó +
10 ó más en todo el frotis	Pocos ó + +
1 ó más por campo.	Numerosos ó + + +

3.- Procedimientos de Laboratorio para el Aislamiento.Homogenización y descontaminación de Espudo.Procedimiento con N acetil- L cisteína e hidróxido de sodio.

(36).

Material.

Tubos de centrifuga estériles de 50 ml. con tapón de rosca.

Pipetas estériles: capilares, de 1.0 y 10 ml.

Portaobjetos.

Centrífuga.

Medios de Cultivo.

2 ó 4 Lowenstein- Jensen para cada especimen.

2 7H10 Agar por cada especimen.

**Reactivos.**

Solución digestante y descontaminante de N acetil - L cisteína e hidróxido de sodio. Para preparar 100 ml. de solución se mezclan las siguientes sustancias:

50 ml. de NaOH al 4% (1.0 N).

50 ml. de Citrato de sodio al 2.9% (0.1N).

0.5 de N acetil - L - cisteína en polvo.

La solución debe usarse dentro de las 24 horas siguientes a su preparación. Se puede utilizar para el siguiente día siempre que se conserve en un frasco bien cerrado y en refrigeración. La primera y segunda soluciones se esterilizan en autoclave.

Agua destilada estéril ó Buffer de fosfatos, pH 6.8.

Solución estéril de albúmina bovina al 2%, pH 6.8.

Tubos con tapón de rosca y agua destilada estéril, -- aproximadamente 4.5 ml. en cada uno.

**Procedimiento.**

a.- Transferir el espécimen a un tubo de centrifuga.-

El volumen del espécimen no debe ser mayor de 1/5 del volumen total del tubo de centrifuga (10.0 ml del espécimen para un tubo de 50 ml. ).

b.- Se añade un volumen equivalente del agente digestante y descontaminante.

c.- Se cierra perfectamente el tubo de centrifuga y se mezcla en un Vortex durante 5 a 20 seg.

d.- Se deja reposar a temperatura ambiente durante 15 min.

e.- Llenar el tubo hasta la mitad con agua destilada estéril ó buffer de fosfatos pH 6.8.

f.- Centrifugar a 3000 rpm por 15 min.

g.- Desechar el sobrante en un frasco conteniendo de s infectante.

h.- Añadir 1.0 a 2.0 ml. de una solución al 2% de al búmina bovina o agua destilada estéril al sedimento. Agitar para mezclar. Esto constituye el sedimento S<sub>1</sub> sin diluir.

i.- Tomar 0.5 ml. de S<sub>1</sub> y añadirle 4.5 ml. de agua destilada. Esta dilución 1/10 es S<sub>2</sub>.

j.- Inocular 2 gotas de S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> sobre la superficie de un medio de Lowenstein - Jensen (2 tubos para cada especimen y sobre la superficie de un medio 7H10 ( un tubo para cada dilución).

k.- Del sedimento S<sub>1</sub> se prepara un frotis.

Método de Hidróxido de sodio. (Método de Petroff) --

(36) .

Reactivos.

Solución al 4% de NaOH.

HCl 2.0 N.

Rojo de fenol o azul de bromotimol.

Procedimiento.

a.- Añadir el esputo en un tubo de centrifuga con un volumen igual de NaOH al 4%.

b.- Mezclar a intervalos. Mantener el especimen en la incubadora a 37° C por 15 ó 20 min.

c.- Centrifugar a 3000 rpm.

d.- Decantar el sobrenadante en un frasco con desinfectante.

e.- Neutralizar el sedimento con HCl 2.0N, añadir al sedimento una gota del indicador y gota a gota añadir el ácido hasta que el indicador vire a amarillo. Evitar el exceso de ácido.

f.- Mezclar el sedimento, inocular y hacer frotis.

Método del Fosfato Trisódico - Zephiran. (36).

Reactivos.

Solución digestante: añadir 7.4 ml. de Zephiran a -- 4.0 l de agua destilada caliente conteniendo 1.0 kg de fosfato trisódico ( $\text{Na}_3 \text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ).

Buffer de fosfatos estéril 1; 15 M, pH 6.6

Procedimiento:

a.- Mezclar volúmenes iguales de sustancia digestan-

te y esputo.

Agitar por 20 min. y dejar reposar por 30 min.

b.- Centrifugar a 3000 rpm por 20 min.

c.- Descartar el sobrenadante.

d.- Suspender el sedimento en 10 a 20 ml. de buffer-  
de fosfatos estéril.

e.- Centrifugar y descartar el sobrenadante.

f.- Inocular el sedimento en los medios apropiados.

Método del Acido Oxálico. (36).

El método está indicado para el tratamiento de espu-  
to de pacientes cuyas secreciones están consistentemente con-  
taminadas con Pseudomonas sp.

Procedimiento:

a.- Se mezclan volúmenes iguales de ácido oxálico al  
5% y esputo en un tubo de centrifuga. Se incuba este tubo du-  
rante 30 min. a 37° C agitando un par de veces durante la in-  
cubación.

b.- Añadir 10 ml. de solución salina fisiológica y -  
mezclar.

c.- Centrifugar a 3000 rpm.

d.- Decantar el sobrenadante fluido.

e.- Neutralizar el sedimento.

f.- Inocular en medios apropiados.

Método de Hipoclorito de sodio ( Clorox) . (36) .

Usado únicamente para microscopía. Los bacilos tuberculosos mueren después de una exposición de 15 min.

Procedimiento.

- a.- Añadir un volúmen equivalente de hipoclorito de sodio al esputo.
- b.- Agitar perfectamente en un Vortex durante 10 min.
- c.- Centrifugar a 3000 rpm por 15 min.
- d.- Decantar el sobrenadante fluido.
- e.- Extender el sedimento sobre un portaobjetos y dejar que se seque.

4.- Otros Fluidos Orgánicos.

El líquido espinal y los fluidos que se acumulan en cavidades serosas inflamadas (pleural, pericardial, peritoneal y sinovial) son asépticamente colectados en tubos estériles y bien sellados. Si el fluido es claro, se centrifuga y decanta, posteriormente es inoculado en el medio. Si el fluido es mucopurulento, denso ó grueso, se trata el sedimento como el esputo.

5.- Tejidos.

Los tejidos de biopsias, especímenes quirúrgicos ó -- autopsias, se trituran en morteros estériles con solución salina estéril ó albúmina bovina estéril. Se transfiere la suspensión a un tubo de centrifuga y se trata como el esputo. Si se-

tiene la certeza absoluta de que el espécimen no está contaminado, el sedimento puede inocularse directamente sobre la superficie de los medios.

#### 6.- Incubación de los Cultivos.

Temperatura. - Incubar todos los cultivos a 35° - 37°C

Los cultivos de lesiones de piel deben también incubarse a 30° - 33° C (M. marimum y M. ulcerans no desarrollan a 37° C en los aislamientos primarios.)

Atmósfera. - Incubar en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% - 10%.

En los medios de cultivo en tubo, los tapones deben quedar flojos durante la primera semana de incubación, para permitir la entrada de aire, posteriormente deben ser apretados. Para que los medios de cultivo en caja no se deshidraten, algunos autores recomiendan el uso de bolsas de plástico permeable que posteriormente se sellan, al colocar la caja de Petri. Otros recomiendan invertir las cajas por 2 ó 3 días de manera que el medio se rehidrate con el agua de condensación acumulada en las tapas.

#### 7.- Tiempo de Incubación.

La mayoría de las especies patógenas para el hombre desarrollan en medios de cultivo apropiados entre 3 a 4 semanas de incubación, M. ulcerans puede requerir 3 ó mas meses de incubación a 30° - 33° C. Cuando se sospecha de tuberculo-

sis, el resultado no se debe reportar negativo hasta el final de la sexta semana de incubación.

### 8.- Inoculación en Animales de Laboratorio.

Para el diagnóstico, el animal de elección es el cuyo. El sedimento (1 - 2 ml.) de un espécimen centrifugado y neutralizado por alguno de los procedimientos de digestión y descontaminación, se inyecta subcutáneamente a nivel de la ingle derecha del animal.

El sitio de la inoculación debe limpiarse con fenol al 2%

El diagnóstico se base en los hallazgos de la necropsia, la distribución y apariencia de las lesiones en los módulos linfáticos, hígado, bazo y pulmones y la demostración de bacilos ácido-alcohol resistentes en frotis de los órganos dañados.

Actualmente la inoculación de animales está limitada a las siguientes indicaciones:

- Fluidos orgánicos en los cuales hay un número escaso de bacilos. ( LCR, líquido pleural. etc.. ).
- Espudo de pacientes cuyos cultivos están consistentemente contaminados.
- Sedimentos urinarios cuando los cultivos son negativos, pero hay evidencia clínica y radiológica de una tuber-

culosis de tracto genitourinario.

La inoculación en conejos no tiene campo en el diagnóstico, se usa principalmente en la identificación diferencial entre M. tuberculosis y M. bovis, cuando los cultivos no tienen características que permitan su total identificación. En el Center for Disease Control (36) utilizan una suspensión salina conteniendo 0.01 mg del bacilo el cual es inoculado intravenosamente en la vena marginal de la oreja del conejo. Generalmente los animales inoculados con M. bovis mueren después de 8 a 10, semanas, pero un inóculo con M. tuberculosis -- nunca mata al conejo.

A P E N D I C E C.Pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación de las Mycobacteria.1. Prueba de niacina en tubo.

Material. Se requieren tubos estériles de 16 X 125 mm.

Reactivos. Agua destilada o solución salina estéril, - solución al 4% de anilina en etanol mantenida en refrigerador y frasco ámbar, solución de bromuro de cianógeno al 10% en agua -- destilada mantenida en refrigerador (si hay formación de precipitados es necesario calentar hasta disolverlos).

Procedimiento. En un tubo de cultivo con desarrollo mínimo de 4 semanas, se añade 1.0 ml de solución salina o agua destilada estériles, después de la extracción se deja reposar por - 15 min. Tomar 0.5 ml del fluido y transferirlos a otro tubo, añadiendo 0.5 ml de anilina (la solución no debe ser colorida), posteriormente añadir 0.5 ml de bromuro de cianógeno, produciéndose un color amarillo, que generalmente aparece inmediatamente. Actualmente existen procedimientos en tiras de papel, disponibles comercialmente (36).

2.- Prueba de catalasa.

Material. Se requieren pipetas capilares de 1.0 y 5.0 ml, tubos con tapón de rosca de 16 X 125 mm, baño a temperatura constante y asa de cultivo.

Reactivos. Solución al 30% de peróxido de hidrógeno, - almacenada en refrigeración, solución al 10% de tween 80 esterilizada en autoclave por 10 min y guardada en refrigerador, el -- sustrato se prepara mezclando volúmenes iguales de tween 80 y -- peróxido de hidrógeno o Superoxol, solución amortiguadora de -- fosfatos 1/15 M a pH - 7.0.

Procedimiento. En la prueba a temperatura ambiente, se añaden una o dos gotas de la mezcla o sustrato al medio de cultivo, sólido, donde hay desarrollo bacteriano, Observar la forma-- ción de burbujas, en un máximo de 5 minutos.

### 3.- Prueba de catalasa a 68°C.

Con una pipeta estéril, tomar 0.5 ml de la solución -- amortiguadora de fosfatos 1/15 M, pH - 7.0 depositándola en un - tubo con tapón con una asada de cultivo, emulsificar la masa bac-- teriana del medio sólido en el tubo que contiene el amortiguador. Posteriormente colocar el tubo en un baño a 68°C por 20 minutos, después de sacar los tubos y dejarlos enfriar a temperatura am-- biente, añadir 0.5 ml de sustrato y observar la formación de bur-- bujas que aparecen en la superficie del líquido.

Dejar reposar por 20 minutos para dar un resultado ne-- gativo.

Existe una prueba semicuantitativa de catalasa, que se reporta en relación con los milímetros de una columna de burbu-- jas puesta sobre la superficie del medio. Esta prueba permite di--

ferenciar entre especies productoras de catalasa en alta y baja concentración (36,74).

#### 4.- Prueba de arilsulfatasa.

Material. Tubos de 18 X 60 mm con tapón de rosca.

Reactivos. Para la elaboración del sustrato se incorpora 1 ml de glicerol y 65 mg de la sal disulfato trisódico de fenoftaleína, esterilizada por filtración, en 100 ml de base de agar oleico de Dubos fundido, esterilizado en autoclave. Colocar 2 ml del sustrato en tubos con tapón de rosca. Solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M (100 ml ).

Procedimiento. Inocular una gota de la suspensión bacilar en los tubos con base de agar oléico de Dubos, incubando a  $37^\circ\text{C}$  por tres días, y por 2 semanas para las Mycobacteria de lento desarrollo, añadir 1 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y observar una coloración rosa de la fenoftaleína libre. Se reporta en cruces de 1+ a 5+ de acuerdo a estándares preparados con una solución base de fenoftaleína (como sal de sodio) al 0.1% en agua destilada (74).

#### 5.- Prueba de reducción de nitratos.

Material.- Los cultivos para realizar esta prueba deben ser de no más de 3 a 4 semanas para los de desarrollo lento y de 2 a 4 semanas para los de desarrollo rápido.

Tubos con tapón de rosca de 16 X 125 mm y baño a temperatura constante.

Reactivos. HCL concentrado diluido 1:2, solución al --

2% de sulfanilamida, solución al 1% de dihidrocloruro de N-naftiletilendiamina, solución de  $\text{NaNO}_3$  0.01 M en amortiguador de fosfatos 0.022 M, pH 7.0 y polvo de zinc, las soluciones se mantienen a temperatura ambiente.

Procedimiento. Colocar unas gotas de agua destilada estéril en un tubo con tapón de rosca, añadiendo una asada del desarrollo bacteriano y 2 ml de  $\text{NaNO}_3$ . Agitar la mezcla e incubar en un baño a 37°C por 2 horas. Se añaden, 1 gota de HCl, 2 gotas de - - N-naftiletilendiamina y 2 gotas de sulfanilamida. Examinar inmediatamente el desarrollo de un color rojo a rosa. A los tubos negativos se les añade polvo de zinc y éste reduce el nitrato a nitrito. Para esta prueba ya existe un método en tiras de papel de manera comercial, desarrollado por los Laboratorios Difco, Detroit, Mich. (74).

#### 6.- Prueba de hidrólisis de tween 80.

Material. Tubos de 16 X 125 mm con tapón de rosca.

Reactivos. Para el sustrato se combinan 100 ml de amortiguador de fosfatos 1/15 M, pH 7.0, 0.5 ml de tween 80 y 2 ml de una solución acuosa al 1% de rojo neutro. Colocar 2 ml del sustrato en los tubos y esterilizar en autoclave durante 10 minutos, después de esterilizar, el líquido tiene un color ámbar. El sustrato debe almacenarse en refrigerador y en frasco ámbar, por no más de 2 semanas.

Procedimiento. Suspender en el tubo con sustrato una asada del desarrollo bacteriano e incubar a 37°C. El desarrollo de un color rosa indica un resultado positivo, los tubos se leen a las 24 horas, 5 días y 10 días, es importante no agitar los tubos cuando se realizan las lecturas.

7.- Prueba de reducción de telurito.

Material. Tubos de 20 X 50 mm con tapón de rosca. Los cultivos de aproximadamente 7 días, se emulsionan en 5 ml de medio de Middlebrook 7H9 contenido en los tubos. Este desarrollo debe ser turbio.

Reactivos. Solución acuosa al 2% de telurito de potasio, colocar de 2 a 4 ml en tubos para esterilizar en autoclave por 10 minutos.

Procedimiento. Añadir 2 gotas de la solución de telurito a los tubos conteniendo medio Middlebrook 7H9 e incubar a 35 - 37°C por un período de 7 días, examinando los tubos cada día. Un precipitado negro metálico indica una prueba positiva (36).

A P E N D I C E D.Procedimientos utilizados en las pruebas de susceptibilidad a drogas.1.- Métodos y medios de cultivo.

La técnica más apropiada para la elaboración de medios de cultivo conteniendo la droga, es la descrita por Wayne y Krassnov. (151), en la cual se utilizan discos que contienen cantidades estandarizadas de la droga y que son colocados en cuadrantes individuales de las cajas de petri (método directo).

La tabla 10 muestra la distribución de los discos -- que contienen la droga para las pruebas de susceptibilidad.

Se prepara base de agar 7H10 ó 7H11 con enriquecimiento OADC (ácido oléico, albúmina, dextrosa y catalasa), cuidando de no sobrecalentar la base durante la esterilización. Se requieren aproximadamente 50 ml. de medio para 10 cuadrantes. Posteriormente se incuban las placas conteniendo los discos -- con la droga durante toda la noche, para permitir la difusión de ésta y probar la esterilidad del medio.

En la tabla se muestran las diluciones apropiadas para los especímenes que se trabajan con el método directo, se inocula aproximadamente 0.1 ml. del especimen, tratado por algún método de digestión, en cada cuadrante.

En el método indirecto se suspende la masa bacteriana en 4 ml. de caldo de Dubos con albúmina y tween 80, mezclando

se por agitación en un vórtex durante 1 minuto, procurando no producir aerosoles.

Dejar reposar por 15 minutos.

Diluir la suspensión en caldo de Dubos hasta obtener una turbidez escasa, de ésta se preparan diluciones de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ , sembrandose 0.1 ml. de la dilución  $10^{-2}$  en el cuadrante de control 1 y en cada uno de los cuadrantes que contienen la droga.

De la dilución  $10^{-4}$  se siembra el cuadrante de control 2.

Si el cultivo a probar es viejo (más de 6 semanas de incubación), es necesario resembrar en caldo de Dubos con albúmina y tween (36).

## 2.- Incubación y lectura de las pruebas.

Las placas se incuban a  $37^{\circ}$  C en atmósfera de  $CO_2$  - - (de 5 a 10%) y se leen cada semana por un período de 3 semanas. La cantidad de desarrollo se reporta como sigue:

<u>Número de colonias.</u>	<u>Reporte (resistencia).</u>
Innumerables o confluentes.	+ + + a + + + +
Aproximadamente de 100 a 200 colonias.	+ +
De 50 a 100 colonias.	+
Menor de 50 colonias.	Escasa.

En la mayoría de los casos es posible estimar si la proporción de colonias resistentes es menor o mayor del 1%. Cuando el desarrollo en el cuadrante que contiene la droga, excede el desarrollo del cuadrante usado como control en la siguiente dilución, ( $10^4$ ), entonces más del 1% de la población es resistente a la droga.

Para la lectura de las pruebas se utiliza un microscopio de disección, utilizando un objetivo de 30 a 60 X y luz transmitida.

Hugo L. David en su libro Bacteriología de las Mycobacteriosis (36) recomienda ajustar la suspensión de bacterias al estandar No. 1 de la escala de MacFarland, con agua destilada estéril o solución salina estéril, el estandar No. 1 de MacFarland se prepara añadiendo 0.1 ml. de una suspensión al 1% de  $BaCl_2$  a 9.9 ml. de  $H_2SO_4$  al 1%. De esta suspensión se realizan diluciones ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  etc.) para sembrar en las placas que contienen las drogas.

En relación con el tamaño del inóculo recomienda lo siguiente:

$1 \times 10^8$  bacilos pesan aproximadamente 1.0 mg. (peso seco).

El estándar No. I de MacFarland = aproximadamente 0.1 mg. = aproximadamente  $1.0 \times 10^7$  bacilos = aproximadamente una absorbancia de 0.01 a 650 nm. en un medio 7H9.

El tamaño del inóculo no debe exceder 100,000 bacilos.

Para reportar, se recomienda contar el número de colonias en el medio de control y en el medio que contiene la droga calculando el número de sobrevivientes. Se reporta la proporción como un porcentaje de células resistentes.

### 3.- Pruebas de susceptibilidad a drogas secundarias.

Estas pruebas están limitadas a ciertos laboratorios de referencia. En general, los métodos y medios utilizados para las drogas primarias son los mismos que se utilizan para las drogas secundarias. Las drogas secundarias que más frecuentemente se prueban son: cicloserina, kanamicina, viomicina y pirazinamida.

Tabla 10.

Distribución de discos conteniendo droga para las pruebas de susceptibilidad.

<u>Placa No.</u>	<u>Cuadrante.</u>	<u>Droga.</u>	<u>g por disco.</u>	<u>Concentración final g/ml.</u>
1	1	Control 1	-	0
	11	Insoniacida	1	0.2
	111	Insoniacida	5	1.0
	1V	Etambutol	25	5.0
2	1	Control 2	=	0
	11	Estreptomicina	10	2.0
	111	Estreptomicina	50	10.0
	1V	Rifampicina	5	1.0
3	1	Ac. p-aminosalicílico	10	2.0
	11	Ac. p-aminosalicílico.	50	10.0
	111	-----		-
	1V	-----		-

Diluciones apropiadas para especímenes concentrados inoculados - por el método directo.

No. de bacilos ácido-alcohol resistentes - por campo (objetivo - de inmersión)	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante con droga.
Menor de 1	Sin diluir	$10^{-1}$	Sin diluir.
De 1 a 10	$10^{-1}$	$10^{-3}$	$10^{-1}$
Más de 10.	$10^{-2}$	$10^{-4}$	$10^{-2}$

Tomadas de : Manual of Clinical Microbiology (1974) Second Edition.  
Chapter 16, pages 170-175. Published by American Society of Microbiology.