

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"MODIFICACION AL METODO TRADICIONAL PARA LA
CONCENTRACION DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS"

23

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a:

PRUDENCIO ARITA RAMIREZ

MEXICO, D. F.

1974



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.

Tesis
AÑO. 1944
FECHA
PROC. 117 21



QUIMICA

PRESIDENTE: Q.F.B. Oscar Amor Dodero
VOCAL: Q.F.B. Magdalena Acosta Segura
SECRETARIO: Q.F.B. Catalina Orozco Victoria
1er. SUPLENTE: Q.F.B. Ernestina Ballesteros Rueda
2do. SUPLENTE: Q.F.B. Socorro Cao Romero Martínez

Sitio donde se desarrolló el tema:

H.G. Dr. Darío Fernández, del ISSSTE

Sustentante: Prudencio Arita Ramírez
Asesor del tema: Q.F.B. Magdalena Acosta Segura
Supervisor Técnico: Dr. Antonio Capella Bustos

A la memoria de mi padre
Dr. Prudencio Arita H.
que el destino quiso no conociera

Con cariño a mi madre
Sra. Sara R. Vda. de Arita
a quien debo todo lo que soy

A Sara Lucy y Enma Judith
con fraternal cariño

A la memoria de mi padre
Dr. Prudencio Arita H.
que el destino quiso no conociera

Con cariño a mi madre
Sra. Sara R. Vda. de Arita
a quien debo todo lo que soy

A Sara Lucy y Enma Judith
con fraternal cariño

Con agradecimiento a

Dr. Antonio Capella Bustos
que hizo posible esta investigación

Q.F.B. Magdalena Acosta Segura
por su atinada y valiosa ayuda

A todas las personas que directa o indirectamente
hicieron posible la realización de esta investigación
muy especialmente a la Q.F.B. Ma. de Jesús Pacheco, del
Hospital de Enfermedades del Tórax del I.M.S.S.

A todas aquellas personas que me brindaron una
real amistad durante mi permanencia en este país

I N D I C E

	Página
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	4
a) Recientes avances sobre la baciloscopia	5
b) Métodos de concentración	7
c) Aspecto fisicoquímico del- método propuesto	10
MATERIAL Y METODOS	15
RESULTADOS	24
RESUMEN	31
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFIA	37

I N T R O D U C C I O N

La prueba definitiva de una infección tuberculosa só lo se tiene por la demostración de M. tuberculosis en las -- muestras de los productos patológicos del paciente sospecho- so.²

En extensos estudios de detección de casos nuevos, - hay pacientes que eliminan pocos microorganismos en el espu- to. Además, en casos antiguos en tratamiento, es a menudo - difícil aislar microorganismos aunque se trate de casos acti- vos. Frecuentemente se presentan pacientes con una enferme- dad activa extensa y sin embargo el número de Mycobacteria - visibles en el examen directo de esputo, es muy escaso, por- lo que se hace necesario someter a las muestras a un proceso de concentración.^{4,5}

Existe una variedad de métodos de concentración para el M. tuberculosis, pero el más usado es el método de homoge- neización con sosa propuesto por Petroff.⁶

Se analiza aquí un método propuesto por el Dr. A. Ca- pella para la concentración de Mycobacterium en esputo. --- Nuestro propósito fue investigar qué tan eficiente es este -

método comparado con la técnica directa, el método tradicional de Petroff y el método que usa un volumen de alcohol por 6 de homogenizado. La metodología seguida y los resultados obtenidos constituyen el presente trabajo de tesis.

GENERALIDADES

a) RECIENTES AVANCES SOBRE LA BACILOSCOPIA

1. Fluorescencia

La auramina y la rodamina se usan para teñir mycobacteria; especialmente M. tuberculosis y los grupos I, II y -- III de las mycobacteria atípicas. El fluorocromo es retenido por los microorganismos ácido-alcohol resistentes y con la excitación del fluorocromo por la luz de una adecuada longitud de onda los microorganismos fluorescen, lo cual puede ser detectado con un microscopio de campo oscuro o campo luminoso. La luz de fondo es absorbida por un sistema de filtros que dejan pasar sólo la luz producida por la fluorescencia. Recientemente ha habido un renovado interés en el uso del microscopio de fluorescencia para la observación de los organismos ácido-alcohol resistentes.¹³

Koch y Kote¹¹ nos presentan un reporte en apoyo a la tesis de que la microscopia fluorescente es muy superior a la tinción rutinaria de Ziehl-Neelsen para demostrar los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), en concentrados de esputo y secciones de tejido. Con el uso del método fluorescente los resultados positivos fueron aumentados en un 43% -

en 427 concentrados de esputos y en un 74% en 136 secciones de tejidos.

Silver et al,¹² dicen que la técnica de tinción por fluorescencia es tan fácil y rápida como la de Ziehl-Neelsen y que es más efectiva para demostrar los microorganismos ácido-alcohol resistentes. Estos autores han hecho modificaciones al método que consisten básicamente en emplear en la tinción una combinación de colorantes de auramina y rodamina y permanganato de potasio como colorante de contraste, después de que el material es decolorado con alcohol-ácido. Los ~~BA~~ R no se decoloran después de la tinción.

Cuando se usa auramina o rodamina, la luz ultravioleta no es absolutamente necesaria puesto que pueden ser excitados por luz de más de 4.960 \AA (496 m μ), pudiéndose hacer la observación en un microscopio común.

2. Inmunofluorescencia

Martins y colaboradores (1973), describen la preparación de un anticuerpo fluorescente tipo-específico para la identificación de 11 cepas de mycobacteria. El suero frente a estas 11 cepas fue obtenido inyectando conejos con bacterias muertas por radiación ultravioleta. El suero fue purificado y conjugado con isotiocianato de fluoresceína y fue -

usado para la prueba directa de fluorescencia. El empleo de estos sueros es un método rápido de identificación para mycobacteria dentro de un serogrupo dado.¹⁴

Jones y colaboradores (1967), reportan el procedimiento directo con anticuerpos fluorescentes para identificar M. tuberculosis en esputo. De un total de 135 muestras, estos autores recuperaron el bacilo tuberculoso por cultivo en 96 casos; mientras que se encontraron otras mycobacterias en 6 muestras. El uso de un conjugado específico para M. tuberculosis facilitó la tinción directa de este organismo en el 98% de los casos, no se observó fluorescencia en ninguna de las otras cepas de mycobacteria con este conjugado.¹⁵

Pero estos métodos no han recibido amplia aceptación hasta ahora por varias limitaciones, como la necesidad de personal, material y equipo especializados y por los problemas que significan las reacciones cruzadas entre algunas cepas.¹³

b) METODOS DE CONCENTRACION

En 1954, Dubos¹⁶ estableció lo siguiente: "Las primitivas técnicas bacteriológicas elaboradas hace varias décadas para la detección de bacilos tuberculosos y otros agentes patógenos en el esputo, aún se emplean hoy en día. Sin-

embargo, también es cierto que la mayor parte de los bacilos no sobreviven al bárbaro tratamiento con ácidos y álcalis a que son sometidos durante la preparación de muestras para -- cultivo".

El tratamiento previo del esputo antes de su examen tiene el objetivo de: 1) fluidificar el esputo de modo que los microorganismos puedan distribuirse más uniformemente en la muestra que va a ser examinada o cultivada; 2) disminuir su densidad a fin de permitir la concentración de los microorganismos mediante centrifugación; 3) descontaminar la muestra de otros microorganismos distintos a las mycobacteria, permitiendo a la vez una máxima supervivencia para los bacilos tuberculosos, y 4) reducir el volumen de la muestra, y permitir manejarla con más facilidad.

El método más ampliamente usado es el de Petroff⁶ -- con hidróxido de sodio. Corper y Stoner en 1946,¹⁷ propusieron el empleo de fosfato trisódico por su menor toxicidad para las mycobacteria. El Zephiran se ha empleado como agente descontaminador con el fosfato trisódico y el hidróxido de sodio. Se han recomendado otras varias modificaciones, como la propuesta en 1963 por Kubica y colaboradores,¹⁸ empleando como agente mucolítico N-acetil-L-cisteína (NALC) e hidróxido de sodio; estos autores dicen que resulta un método menos

enérgico para la descontaminación y fluidificación;^{4,7,2} sin embargo, estos últimos métodos no se han generalizado.

Han sido descritas diversas técnicas nuevas de concentración empleando varias enzimas y parecen tener bastantes probabilidades de uso en un futuro, pero todavía no tienen una evaluación adecuada. Se ha afirmado que estos procedimientos son menos tóxicos que otros métodos en uso para el bacilo tuberculoso y otras mycobacteria, y deben ser investigados a fondo. El uso de tripsina, para el aislamiento de bacilos ácido-alcohol resistentes fue descrito por Haynes en 1942.¹⁹ Este método es el de elección para preservar detalles celulares y también se ha probado que es un medio eficiente para la concentración de bacterias y hongos en esputo y en líquidos de aspiración bronquial.¹³

Una técnica poco conocida es la descrita por Fraga en 1964,²² que aplica un método electroforético a la separación de M. tuberculosis en los líquidos orgánicos. El método está basado en que el bacilo de Koch es un microorganismo con carga eléctrica negativa, aún cuando en ocasiones reacciona con carga positiva, sin saberse aún el por qué de este fenómeno. Esta técnica consiste en someter el líquido orgánico, en que se sospecha la presencia del bacilo tuberculoso, a la acción de un campo eléctrico producido por una pila de-

7.5 v, durante 15 minutos, el líquido deberá ajustarse a pH-ácido, los bacilos tenderán a desplazarse y concentrarse, en el electrodo con carga eléctrica contraria a la que poseen, -facilitándose su recolección e identificación. Este método -puede substituir con ventaja al procedimiento clásico de cen-trifugación, es más fácil y produce una mayor concentración-de bacilos tuberculosos.²⁰ Las muestras de orina y líquido-cefalorraquídeo se someten a examen por esta técnica sin nin-gún tratamiento previo, en cambio el esputo se trata como se hace para la técnica de concentración por centrifugación.²²

En 1973 Grigor'ev y colaboradores,²¹ describen los -procedimientos usados en la concentración electroforética de M. tuberculosis. Estos autores dicen que la efectividad del método depende de un número de factores como: exposición, na-turaleza del electrólito, nivel de pH, material del electrodo, productos de la electrólisis y viscosidad del material -por probar. /

c) ASPECTO FISICOQUIMICO DEL METODO PROPUESTO

La centrifugación de material patológico ha sido re-comendada como un medio eficaz para concentrar bacilos tuber-culosos. La centrífuga de laboratorio ordinaria con 2.000 a 3.000 revoluciones por minuto, no es un instrumento eficien-

te para la concentración de bacilos tuberculosos en material patológico si se usa por corto tiempo.²³ La centrifugación-prolongada fue recomendada por Scartozzi;²⁴ Robinson y Stovall.²⁵ La concentración de bacilos tuberculosos por medio de centrífugas de alta velocidad ha atraído particularmente la atención de los investigadores. Este método fue recomendado por Davy y Levanditi.²⁶ Las bases teóricas del método fueron aclaradas por Schmidt-Lange.²⁷

La velocidad de sedimentación de una partícula más pesada que el líquido en el cual está flotando puede ser acelerada centrifugando el líquido. La velocidad de sedimentación de un cuerpo redondo, como lo demuestra la ecuación de Stokes, es directamente proporcional al cuadrado de su radio y a la diferencia entre las densidades del cuerpo y el líquido que lo rodea, y es inversamente proporcional a la viscosidad del medio circundante:

$$v = \frac{2 \text{ gr}^2 (d_1 - d_2)}{9 \text{ n}}$$

donde r es el radio de la esfera, d_1 y d_2 las densidades de la esfera y el medio respectivamente, y n el coeficiente de viscosidad. La densidad del bacilo tuberculoso es sólo ligeramente mayor que la del agua. Por causa de esto, después de la centrifugación de un líquido denso (esputo purulento), la

mayoría de los bacilos se encontrarán en el sobrenadante. -- En el caso de un líquido viscoso (esputo mucoso), los baci-- los no se sedimentarán. De acuerdo con Almquist,²⁸ los baci-- los tuberculosos se encuentran en la parte superior del so-- brenadante cuando se emplea una solución de ioduro de sodio-- de densidad 1.4 a 1.5 centrifugando por 30 minutos a una ve-- locidad de 8.000 rpm, y se sedimentan cuando la densidad de-- esta solución es de 1.2 ó 1.3.

La velocidad de sedimentación de la partícula aumen-- ta con el cuadrado de su radio; si la partícula es bastante-- pequeña la fuerza de centrifugación dada no la sedimentará.-- La sedimentación de estas partículas puede lograrse aumentan-- do la fuerza de centrifugación. La fuerza de centrifugación en kilogramos, producida por una máquina puede ser calculada de la fórmula:

$$C = \frac{M \cdot V^2}{r}$$

donde M es masa en kilogramos, V velocidad en metros por se-- gundo, y r el radio. Cuando en la fórmula de arriba, M y r-- son iguales a la unidad, la fuerza de centrifugación aumenta con el cuadrado de la velocidad. Así, cuando en lugar de -- una centrífuga que produce 3.000 revoluciones por minuto, se usa una que dé 15.000 revoluciones, el aumento en la fuerza-- centrífuga será de $15.000^2 \div 3.000^2$, o sean 25 veces, y las--

partículas con diámetro 25 veces más pequeño se encontrarán en el sedimento; las partículas con el mismo diámetro se sedimentan 25 veces más rápido en una centrífuga con 15.000 revoluciones que en una centrífuga con 3.000 revoluciones.

El funcionamiento de varios rotores puede ser expresado por el índice de funcionamiento (P) propuesto por Piskels en 1951:

$$P = \frac{(\text{rpm})^2}{\log_e R_2 - \log_e R_1}$$

en la cual R_2 es la distancia radial máxima y R_1 es la distancia radial mínima o el nivel del líquido en el tubo de centrífuga.

El valor práctico de estas consideraciones teóricas fue investigado por Kroger y Rosarius,²⁹ quienes encontraron que la centrifugación a alta velocidad de material patológico, aumentaba los resultados positivos en un 2% comparado con el resultado de una centrifugación ordinaria. Ahrens y Wanke³⁰ investigaron el valor de la centrifugación a alta velocidad en experimentos con 1.000 esputos. La microscopia directa de los sedimentos obtenidos indicó un aumento en el número de bacilos en los especímenes centrifugados a alta velocidad, pero nunca se alcanzó el resultado de la concentración predicha por la teoría.³

De acuerdo con lo anterior, vemos pues que lo importante de un método de concentración es que la densidad del homogenizado sea cercana a la del agua y que la viscosidad sea nula, para poder aumentar la velocidad de sedimentación y que las partículas que se hallen flotando en el líquido -- sean sedimentadas con mayor facilidad.

El esputo es un medio cuya densidad es alta, la adición de NaOH da por resultado una suspensión (homogenizado) de una densidad más baja que la del esputo por sí solo. Si esta densidad se logra bajar más, a tal grado de llevarla -- cercana a la del agua, las partículas suspendidas en este me dio serán sedimentadas con mayor facilidad. La densidad del bacilo tuberculoso, como vimos en párrafos anteriores, es un poco mayor que la del agua, por lo que es de esperarse que su sedimentación en ese medio será fácil.

En el método propuesto tratamos, mediante la adición de un volumen igual de alcohol al homogenizado con NaOH, tener un líquido cuya densidad sea muy cercana a la del agua. -- Suponemos que si con la adición de NaOH volumen a volumen -- con el esputo, se obtiene un homogenizado de cierta densidad, esta densidad será todavía abatida mucho más con la adición de un volumen igual de alcohol. Esta teoría es lo que trata de comprobar el presente estudio.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se colectaron 131 muestras de esputo, obtenidas por expectoración voluntaria, de consistencia y aspectos variables, provenientes de pacientes tuberculosos de los siguientes hospitales:

102 muestras del Hospital para Enfermedades Pulmonares, de Huipulco, de la SSA.

23 muestras del Hospital de Enfermedades del Tórax, del IMSS.

6 muestras del Hospital General Dr. Darío Fernández, del ISSSTE.

REACTIVOS:

Solución de NaOH al 4%

Solución 2N de HCl

Alcohol etílico al 96%

Etanol-HCl (etanol al 96%, 9.5/3)

Tween 80

Rojo de fenol al 0.04%

COLORANTES:

a) Solución de fucsina fenicada:

Sol. A.: Fucsina básica (con un	
90% de colorante)	0.3 g
Alcohol etílico (al 96%)	10.0 ml
Sol. B.: Fenol	5.0 g
Agua destilada	95.0 ml
Mezclar las soluciones A y B	

b) Solución de Azul de metileno alcalino de Loeffler:

Sol. A.: Azul de metileno (con un	
90% de colorante)	0.3 g
Sol. B.: KOH al 0.10%	100.0 ml
Mezclar las soluciones A y B	

APARATOS:

Agitador mecánico de Kahn

Centrífuga con cabezal para tubos de 15 ml

Microscopio

EQUIPO:

Portaobjetos de 75 x 25 mm, limpios y nuevos

Tubos sin labio de 15 x 125 y de 13 x 100 mm

Frascos con capacidad para 50 ml aproximadamente, --
con tapón de rosca, boca ancha; estériles.

Pipetas de 5 y 10 ml

Bureta de 50 ml

Cajas de Petri

Asas de platino calibradas

Mechero Bunsen

Platina calentadora

METODOS:

Una vez hecho el examen directo, la muestra se dividió en tres porciones para poder aplicar simultáneamente las técnicas de concentración que a continuación se describen.

1. TECNICA PARA EL EXAMEN DIRECTO

Se vierte la muestra en una caja de Petri colocada - sobre un fondo oscuro y por medio de un asa de platino se - toma una muestra de las porciones que presenten aspecto puru - lento, sanguinolento o caseoso y se coloca entre dos portaob - jetos nuevos y limpios, extendiéndola mediante presión entre los dedos, cuando la muestra está perfectamente extendida, - se desliza un porta sobre el otro y así se obtiene una pelí - cula delgada, adecuada para la coloración y la observación - al microscopio.^{8, 2}

2. METODO PARA LA TINCION DE ZIEHL-NEELSEN

- a) Fijar la extensión a la flama
- b) Cubrir con fucsina fenicada, calentar suavemente durante 5 minutos sobre una platina calentadora, - se producirá una evaporación ligera. No se debe permitir que se evapore del todo y se añade más - colorante según se vaya necesitando.
- c) Lavar con agua.
- d) Decolorar en alcohol-ácido hasta que desaparezca el color del líquido de lavado.
- e) Lavar con agua.
- f) Teñir durante 3 minutos con azul de metileno de - Leoffler (coloración de contraste).
- g) Lavar con agua y dejar secar.^{4, 9}

3. TECNICA PARA EL METODO DE CONCENTRACION DE PETROFF

- a) Se añade a la muestra un volumen igual de hidróxi do de sodio al 4%.
- b) La mezcla se deja en un agitador mecánico durante 20 a 30 minutos, dependiendo de su viscosidad ini cial, pero bajo ninguna circunstancia es aconseja ble pasar de los 30 minutos, ya que una exposi--- ción prolongada al álcali puede destruir al Myco- bacterium.

- c) La mezcla se neutraliza con HCl 2N usando rojo de fenol como indicador.
- d) Centrifugar a 3.000 rpm, durante 20 minutos.
- e) Tomar la muestra para la investigación de BAAR en el sobrenadante.
- f) Decantar el líquido sobrenadante, en un frasco de 50 ml para su posterior esterilización.
- g) Del sedimento se tomará una muestra para hacer extensiones que se tiñen por el método antes descrito. 1, 2, 4, 6, 7

4. TECNICA PARA EL METODO DE CONCENTRACION CON HIDROXIDO DE SODIO Y ALCOHOL 1:6

- a) Se colocan aproximadamente 6 ml de la muestra en una cápsula de porcelana, se adiciona un volumen igual de hidróxido de sodio al 4%.
- b) Se mezcla perfectamente bien hasta que la mezcla esté homogénea y completamente fluída.
- c) Se vierte el contenido de la cápsula en dos tubos de centrifuga que contenga 1 ml de alcohol etílico de 96% para abatir la densidad.
- d) Se centrifuga a 3.000 rpm durante 15 minutos.
- e) Tomar la muestra para la investigación de BAAR en el sobrenadante.
- f) Decantar el líquido sobrenadante en un frasco de-

50 ml para su posterior esterilización.

- g) Con el sedimento se hacen extensiones que se dejan secar al aire, se fijan a la flama y se tiñen por el método ya descrito.⁸

5. TECNICA PARA EL METODO DE CONCENTRACION PROPUESTO

- a) Agregar a la muestra un volumen igual de hidróxido de sodio al 4%.
- b) Homogenizar en agitador mecánico durante 20 a 30 minutos, dependiendo de la viscosidad de la muestra, pero no debe pasar de 30 minutos.^{1, 4, 7}
- c) Neutralizar con HCl 2N, usando rojo de fenol como indicador.
- d) Pasar de este homogenizado 6 ml aproximadamente en un tubo que contenga igual volumen de alcohol-etílico de 96%.
- e) Centrifugar el tubo a 3.000 rpm durante 20 minutos.
- f) Tomar la muestra para la investigación de BAAR en el sobrenadante.
- g) Decantar el sobrenadante en un frasco de 50 ml para su posterior esterilización y del sedimento -- preparar extensiones que se dejan secar, se fijan y tiñen por el método antes descrito.

6. ADICION DE TWEEN 80

Por indicación del asesor de esta tesis, se estudiaron 47 muestras procesadas por cada uno de los métodos de -- concentración descritos anteriormente y al momento de centrifigar el homogenizado, se adicionó una gota de Tween 80 a cada uno de los tubos y se mezcló cuidadosamente, pensando que al abatir aún más la tensión superficial se aumentaría el número de bacilos sedimentados.

7. TECNICA PARA LA INVESTIGACION DE BACILOS EN SOBRENADANTES

Con objeto de saber qué cantidad de bacilos quedaron en los sobrenadantes de los tres métodos de concentración -- efectuados, se procedió a realizar la investigación de bacilos en cada uno. Después de centrifugar cada uno de los tubos, se tomó del sobrenadante cuatro veces con un asa de platino calibrada. Las muestras así obtenidas se pusieron sobre un portaobjetos nuevo y se dejaron secar, se fijaron a -- la flama y se tiñeron por el método de Ziehl-Neelsen.

8. INTERPRETACION

En los sedimentos se contó el número de bacilos que había en 80 campos de una preparación. Se contó el mismo número de campos para la investigación de bacilos en los sobre

nadantes. Para llevar la cuenta de los microorganismos se -
empleó un aparato para hacer diferenciales en hematología.

R E S U L T A D O S

Mencionaremos de ahora en adelante a la técnica directa como el método I, al método de concentración de Petroff como II, al método que usa 1 volumen de alcohol por 6 de homogenizado como III y al método propuesto en el cual se adiciona al homogenizado un volumen igual de alcohol como el método IV.

El total de muestras procesadas sin la adición de Tween 80 fue de 84, de las cuales 76 resultaron positivas y 8 negativas por todos los métodos; los resultados obtenidos por la técnica directa y los tres métodos de concentración se encuentran en el cuadro 1.

Obtuvimos de un total de 84 muestras por la técnica directa 57 positivas y 27 negativas. El total de positivas fue el menor porcentaje obtenido (68%) en este número de muestras. El número de muestras en que hubo un mayor número de bacilos fue de seis casos.

El total de positivas por el método II fue de 70, que corresponde a un 83% del total. Las veces en que por este método se observó un número mayor de bacilos comparativamente con los demás métodos fue de 21 casos. Con el método

Método	Técnica directa	Concentración		
	I	II	III	IV
Total de muestras	84	84	84	84
Total de positivas	57	70	72	71
Total de negativas	27	14	12	13
% de positivas	68	83	86	84
Mayor cantidad de bacilos (casos)	6	21	30	24

Cuadro 1

Técnica directa y sedimentos de los métodos de concentración sin la adición de Tween 80

III se obtuvo mayor cantidad de casos positivos; de 84 muestras se obtuvieron 72 positivas (86%). El número de muestras que mostraron mayor número de bacilos fue de 30 casos (el mayor número obtenido).

Por el método IV se encontraron más bacilos en 24 casos, obteniéndose 71 muestras positivas que corresponde a un 84%. Vemos pues que el porcentaje de positivas por los métodos de concentración varía entre el 83 y el 86%, es decir, sensiblemente los tres métodos estudiados dieron resultados similares, sin embargo, se ve claramente que el porcentaje de casos positivos si se incrementa con la concentración, ya que el método directo (I) sólo mostró el 68% de casos posi

vos. El porcentaje mayor de positivas de los métodos de concentración fue para el método III. La investigación de bacilos en los sobrenadantes de estas 84 muestras dio los resultados anotados en el cuadro 2. Podemos observar que el por-

Investigación de bacilos en los sobrenadantes			
Método	II	III	IV
Total de muestras	84	84	84
Total de positivas	33	25	3
Total de negativas	51	59	81
% de positivas	39	30	3
Mayor cantidad de bacilos (casos)	27	11	0

Cuadro 2

Investigación de bacilos en los sobrenadantes de los métodos de concentración sin la adición de Tween 80

centaje de hallazgos de bacilos en los sobrenadantes es mayor en el método II y menor en el IV. El total de resultados negativos en el método IV fue de 81, de las 84 muestras procesadas. En los métodos II y III nos dan 51 y 59 respectivamente. El método IV resultó ser la técnica que menos ba

cilos tuvo en sus sobrenadantes. Comparando con los métodos III y IV, la mayor cantidad de bacilos obtenida en los sobrenadantes fue siempre en el método II.

El número de muestras tratadas con Tween 80 fue de 47, de las cuales 43 resultaron positivas, 4 fueron negativas por todos los métodos y una por métodos de concentración. Los resultados se encuentran en los cuadros 3 y 4.

Del cuadro 3, vemos que el total de positivas por el método I fue de 35, de un total de 47 que corresponde a un 74%. El número de muestras en las que por este método se observó mayor número de bacilos fue de tres casos.

Método	Técnica directa	Concentración con Tween 80		
	I	II	III	IV
Total de muestras	47	47	47	47
Total de positivas	35	38	40	41
Total de negativas	12	9	7	6
% de positivas	74	81	85	87
Mayor cantidad de bacilos (casos)	3	11	17	15

Cuadro 3

Técnica directa y sedimentos de los métodos de concentración con la adición de Tween 80

De un total de 47 muestras, el método II dio 38 positivas (81%); en 11 casos el método II mostró mayor número de bacilos. El método III nos dio un total de 40 positivas, -- que corresponde a un 85% del total. En 17 casos este método mostró mayor número de microorganismos.

El método IV dio 41 muestras positivas, o sea, un -- 87% del total de muestras. Los casos de microorganismos en mayor número fueron de 15. El total de negativas fue mayor por la técnica directa y menor por el método IV, como lo demuestra el porcentaje de positivas. Nuevamente se demuestra que cualquiera de los métodos de concentración es superior a la técnica directa, el porcentaje de positivas por los métodos de concentración varía entre el 81 y el 87%. El más alto porcentaje fue en el método IV.

La investigación de bacilos en los sobrenadantes de los métodos de concentración usando Tween 80, aporta los datos descritos en el cuadro 4.

El total de muestras fue de 47, de las cuales 14 resultaron positivas por los métodos II y III, 2 muestras fueron positivas por el método IV. El menor porcentaje de positivas se obtuvo por el método IV (4%). Los métodos II y III obtuvieron el 30% de positivas cada uno.

Investigación de bacilos en los sobrenadantes con Tween 80			
Método	II	III	IV
Total de muestras	47	47	47
Total de positivas	14	14	2
Total de negativas	33	33	45
% de positivas	30	30	4
Mayor cantidad de bacilos (casos)	12	7	0

Cuadro 4

Investigación de bacilos en los sobrenadantes de los métodos de concentración con la adición de Tween 80

La mayor cantidad de bacilos se encontró en 12 casos en el método II y 7 en el III. En ningún caso el método IV- obtuvo mayor cantidad de bacilos en su sobrenadante que en los otros métodos de concentración estudiados. En la mayoría de las muestras positivas en el sobrenadante la mayor cantidad de bacilos fue encontrada en el método II.

R E S U M E N

Se hace una comparación de preparaciones teñidas por la técnica de Ziehl-Neelsen de muestras provenientes de pacientes tuberculosos.

Se hicieron preparaciones siguiendo la técnica directa. Las muestras fueron concentradas por el método de Petroff, el método de concentración que usa 1 volumen de alcohol por 6 de homogenizado y el método propuesto en que se adiciona un volumen igual de alcohol al homogenizado. Se buscaron bacilos en los sobrenadantes de las muestras sometidas a métodos de concentración.

Por indicación del asesor de esta tesis, se adicionó Tween 80 pensando en aumentar el número de bacilos en los sedimentos. El número total de muestras procesadas fue de 131, de las cuales 47 fueron concentradas con la adición de Tween 80, y 84 sin la adición de Tween.

La técnica seguida para cada método se describe en el capítulo de Material y Métodos. En este estudio se investigaron bacilos en 80 campos de cada preparación. Después de obtener el homogenizado con NaOH, la muestra se neutrali-

zó y se dividió en tres porciones para poder aplicar simultáneamente los tres métodos de concentración en estudio.

Cada muestra en estudio nos proporcionaba cinco laminillas, de las cuales tres pertenecían a los métodos de concentración, una a la técnica directa y una más que correspondía a los sobrenadantes de los tres métodos de concentración.

La investigación de bacilos en los sobrenadantes, se llevó a cabo con el único fin de observar qué método de concentración sedimentaba más bacilos.

Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en los cuadros 1, 2, 3 y 4 del capítulo de Resultados.

C O N C L U S I O N E S

1. De los resultados obtenidos por los métodos de -- concentración, se demuestra que la técnica directa es infe-- rior a los métodos de concentración.

2. Los resultados obtenidos en los sedimentos de los métodos de concentración aquí estudiados, no demostraron una gran diferencia.

3. Los resultados obtenidos en los sobrenadantes de los métodos de concentración, demuestran que el método pro-- puesto contiene menor número de bacilos en comparación con -- los otros métodos de concentración; sin embargo, no se mani-- fiesta un gran aumento en los sedimentos.

4. De lo anterior podemos suponer que la cantidad de alcohol usada durante la centrifugación afecta las caracte-- rísticas tintoriales del bacilo, por lo que no se detectó en mayor número en los sedimentos por el método propuesto y si-- mostró menor cantidad en los sobrenadantes de este método.

5. Desde el punto de vista económico, el método pro-- puesto es más caro, por requerir más alcohol, si se toma en-- cuenta que se espera procesar un alto número de muestras.

6. Los resultados obtenidos en sedimentos y sobrenadantes de las muestras tratadas por la modificación propuesta por el asesor de esta tesis con Tween 80, fueron más cercanas a la teoría.

B I B L I O G R A F I A

1. BBL Manual of Products and Laboratory Procedures. 1968. 5th. Ed. Becton Dickinson and Company. Maryland, U.S.A., 33
2. Bailey, W. R. and E. G. Scott. 1973. Diagnóstico Microbiológico. Trad. de la 3a. ed. Norteamericana. Edit. Med. Panamericana, S. A. Buenos Aires, Argentina, 260
3. Darsins, E. 1958. The Bacteriology of Tuberculosis. 1st. Ed. Univ. Minnesota Press. Minneapolis, U.S.A., 217
4. Davidsohn, I. and J. B. Henry. 1973. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. 5a. ed. Trad. - de la 14a. Ed. Norteamericana. Salvat Editores, S. A., Barcelona, España, 795
5. Darsins, E. and A. Pukite. 1964. Cultivation - of acid-fast organisms from tuberculous patients after prolonged and intensive treatment. Amer. Rev. Resp. Dis., 89:277
6. Petroff, S. A. 1915. Some cultural studies on the tubercle bacillus. Bull. Johns Hopkins --- Hosp., 26:276
7. Lynch, M. E., S. S. Raphael and L. D. Mellor.- 1972. Métodos de Laboratorio. 2a. Ed. Trad. de la Ed. Norteamericana. Edit. Interamericana, - S. A., México, 980
8. Acosta, S. M. 1966. Manual de Prácticas para - el Curso de Bacteriología, Virología y Micología. 2a. Ed. Facultad de Química, UNAM. México. Pract. No. 15
9. Jawetz, E., J. L. Melnick and E. A. Adelberg.- 1970. Manual de Microbiología Médica. 4a. Ed.- Trad. de la Ed. Norteamericana. El Manual Moderno, S. A., México, 218

10. Smith, D. T. et al. 1967. Microbiología de -- Zinsser. 3a. Ed. Trad. de la 13a. Ed. Norteamericana. UTEHA. México, 595
11. Koch, M. L. and R. A. Cote. 1965. Comparison - of fluorescence microscopy with Ziehl-Neelsen-stain for demonstration of acid-fast bacilli in smear preparations and tissue sections. Amer.-Rev. Resp. Dis., 91: 283
12. Silver, H., A. C. Sonnenwirth and N. Alex. --- 1966. Modifications in the fluorescence microscopopy technique as applied to identification of acid-fast bacilli in tissue and bacteriologi--cal material. J. Clin. Path., 19:583
13. Frankel, S., S. Reitman and A. C. Sonnenwirth. 1970. Gradwohl's Clin. Lab. Methods and Diag--nosis. 7a. Ed. The C. V. Mosby Company. Saint-Louis, U.S.A., I:986; II:1059, 1251
14. Martins, R. R., W. E. Walker, G. E. Patayias - and P. W. Gales. 1973. The production of type-specific fluorescent antibody for the identification of mycobacteria. Amer. Rev. Resp. Dis., 108:979
15. Jones, W. D. Jr., R. E. Beam and G. P. Kubica. 1967. Fluorescent antibody techniques with mycobacteria. II. Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum. Amer. Rev. Resp. Dis., - 95:516
16. Dubos, R. J. 1954. Unsolved problems in tuberculosis. Amer. Rev. Tuberc., 70:391
17. Corper, H. J. and R. E. Stoner. 1946. An im---proved procedure for the diagnostic culture of mammalian tubercle bacilli. J. Lab. Clin. Med., 31:1364
18. Kubica, G. P., W. E. Dye, M. L. Cohn and G. -- Middlebrook. 1963. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. Amer. Rev. Resp. Dis., 87:775

19. Haynes, E. 1942. Trypsin as a digestant of --- sputum and other body fluids preliminary to -- examination for acid-fast bacilli. J. Lab. --- Clin. Med., 27:806
20. Velázquez, M. L. 1965. Tesis. Escuela Nacional de Ciencias Químicas. UNAM. México
21. Grigor'ev, R. N., L. A. Stepanova and V. M. Vorocheichikov. 1971. Procedures used in the electrophoretic concentration of M. tuberculosis.- Probl. Tuberk., 49:64
22. Fraga, O. S. 1964. Investigación de M. tuberculosis por Cataforesis. Rev. Mex. de Lab. Clin., 16:41
23. Klein, G. C., M. Maltz, M. M. Cummings and C.-H. Fish. 1952. Efficacy of centrifugation as a method of concentrating tubercle bacilli. Am.-J. Clin. Pathol., 22:581
24. Scartozzi, G. 1939. Sull' influenza della centrifugazione nell'isolamento del micobatterio del tubercolo. G. Batteriol. Immunol., 22:85
25. Robinson, L. and W. D. Stovall. 1941. Factors-influencing demonstration of tubercle bacilli-by concentration methods. J. Lab. Clin. Med.,-27:84
26. Davy, P. E. and J. C. Levanditi. 1938. Role de la centrifugation dans la recherche du bacille de Koch par les procédés d'homogeneization. -- Ann. Inst. Pasteur, 61:300
27. Schmidt-Lange, W. 1941. Schnellere Zentrifugen ins Laboratorium. Klin. Wochenschr, 20:344
28. Almquist, E. 1898. Über eine Methode, das spezifische Gewicht von Bakterien und enderen Körperchen zu bestimmen. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, 28:321.
29. Kröger, E. and M. Rosarius. 1949. Zur Verwendung von schnellen Zentrifugieren in der Methodik des Tuberkelbazillennachweises. Zentralbl. Bakteriol. (Orig. B), 154:213

30. Ahrens, W. and H. Wanke. 1954. Lässt sich die-
Mikroskopische Tb-sputum-diagnose durch Anwendu
ng Schnella u fender Zentrifugen verbessern, -
Dtsch. Gesundheitsw, 9:1153