



46
224

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**DETECCION DE MICOBACTERIAS POR
MICROSCOPIA Y CULTIVO DE MUESTRAS DE TIPO
PULMONAR Y EXTRAPULMONAR EN PACIENTES DEL
HOSPITAL REGIONAL DE ZONA No. 25 DEL
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARGARITA SOLEDAD SOLANO VELAZQUEZ

DIRECTORES: M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMENEZ

O.F.B. PEDRO SEGURA RAMIREZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL -
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS SUPERIORES CUAUTITLAN, A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
PROFESIONALES DE EXAMENES PROFESIONALES SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JALME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Coballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Detección de Micobacterias por Microscopía y cultivo en Bacilos de Tipo Pulmonar, Extrapulmonar en Pacientes del Hospital Regional de Zona N.º 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social.

que presenta la pasante: Margarita Soledad Solano Velázquez con número de cuenta: 8653167-2 para obtener el TITULO de: Química Farmacéutica Bióloga.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 23 de Marzo de 1996

PRESIDENTE	M.M. L. Luz M. Ortega Isidro	
VOCAL	M.M. C. Cecilia Cruz Jiménez	
SECRETARIO	G.E.L. Antonio Escobedo Cárdenas	
PRIMER SUPLENTE	M. en C. Sofía González Galindo	
SEGUNDO SUPLENTE	en C. Stella Maris Restrepo Rivera	

A la F.E.S. Cuautitlán

En especial a la carrera
De Q.F.B. por la formación
Academica recibida.

Al Prof. M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

Por su valiosa ayuda, experiencia
Y entusiasmo. Además por su trato
Amable y comprensión, con admiración
Y profundo agradecimiento en la
Dirección del presente trabajo.

Al Q.F.B. Pedro Segura Ramírez

Por la confianza y apoyo que me
Ofrecio y en especial por el
Asesoramiento para la realización
De este trabajo.

Al laboratorio del Hospital Regional
de Zona Nº 25 del I.M.S.S.

Por brindarme las facilidades
Y todo el apoyo recibidos.

Al Instituto Nacional de Diagnóstico
y Referencias Epidemiológicas (I.N.D.R.E.)
Departamento de Micobacterias.

Por todas las facilidades
Prestadas para la realización
De una importante parte del
Mismo, mil gracias.

A Dios

Quien me ha permitido vivir
Y realizar una ilusión que
Parecía difícil, hoy es toda
una realidad.

A mis Padres

Amparo Velázquez Rangel y a la memoria de
Mi padre Leopoldo Solano Suárez, como una
Muestra de mi más profundo agradecimiento
Y sincero reconocimiento por su cariño, y
El apoyo que me brindaron para poderme
Realizar como persona, y sobre todo en la
Culminación de mi formación profesional.

A mis Hermanos

Victor, Rodolfo, M^a del Pilar
Y Juana, quienes tienen mi
Respeto y cariño.

A ti

En quien siempre he encontrado
Comprensión, cariño y apoyo,
Que me has dado palabras de
Aliento para seguir adelante
Cuando más lo he necesitado.

A los Integrantes del Jurado

Por las correcciones y sugerencias
Realizadas al presente trabajo.

A mis Compañeros y Amigos

Por su amistad, apoyo y motivación que me
Dieron, lo cual ha contribuido de alguna
Manera para seguir adelante y con ello
Terminar mi carrera. Sería injusto mencionar
Sus nombres, ya que son demasiados; por tal
Motivo unicamente quedarán en mi mente y en
Mi corazón.

A todos los que de una u otra forma
Participaron en mi formación
Profesional.

Por esto y tantas cosas más "gracias".

ABREVIATURAS

B.A.A.R.	Bacilos ácido alcohol resistentes
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
AMP	Adenosin monofosfato
TB-RMD	Tuberculosis resistente a multiples drogas
OMS	Organización Mundial de la Salud
T ₂ H	Hidrácida del ácido carboxílico 2-tiofeno
ATS	American Thoracic Society
H37Ra	Cepa de bacilos tuberculosos avirulentos
H37RV	Cepa de bacilos tuberculosos virulentos
RNI	Intermediario de nitrógeno reactivo
PCR	Reacción de la cadena polimerasa
RFLP	Polimorfismo de restricción del fragmento
RIA	Radio inmuno análisis
ELISA	Enzime-linked immunosorbent assays
IG	Indice de crecimiento
STM	Estreptomycin
INH	Isoniacida
RIF	Rifampicina
EMB	Etambutol
NAP	P-nitro-amino-hidroxipiofenona
PANTA	Mezcla antimicrobiana selectiva

INDICE.

	Pág.
I. Resumen	(1)
II. Introducción	(3)
III. Generalidades de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ..	(10)
A. Características del bacilo	(10)
B. Características de crecimiento	(10)
C. Medios de cultivo	(11)
a) Medios no selectivos	(11)
b) Medios selectivos	(11)
D. Identificación	(11)
E. Epidemiología	(12)
F. Patogenia	(13)
G. Manifestaciones clínicas	(17)
a) Tuberculosis pulmonar primaria	(17)
b) Tuberculosis pulmonar crónica	(17)
H. Diagnóstico	(18)
a) Manifestaciones clínicas	(18)
b) Radiografía de tórax	(18)
c) Prueba tuberculínica	(18)
d) Microscopía	(18)
e) Cultivo	(18)
f) Método radiométrico	(19)
g) Métodos genéticos	(19)
I. Tratamiento	(20)
IV. Objetivos	(21)
V. Material y Métodos	(22)
VI. Resultados	(34)
VII. Discusión	(45)
VIII. Conclusiones	(49)
IX. Apéndice	(50)
X. Bibliografía	(53)

RESUMEN.

La tuberculosis es una enfermedad causada por algunas especies del género *Mycobacterium*, cuando se inhalan aerosoles producidos por individuos infectados con tuberculosis pulmonar al estornudar, toser o hablar. La enfermedad puede ocurrir en algún órgano del cuerpo, aunque solamente del 5 al 15% de personas infectadas desarrollarán enfermedad activa en dos años de infección primaria (38).

Durante los últimos años se han observado grandes cambios en la epidemiología de la tuberculosis, se ha notificado un incremento del 20% a partir de 1985. Gran parte del aumento se debe a la aparición de cepas de tuberculosis resistentes a múltiples drogas (TB-RMD) e individuos infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), esto ha enfatizado la necesidad de una rápida identificación de pacientes infectados.

El diagnóstico definitivo de tuberculosis es dependiente del aislamiento e identificación del agente causal, no obstante, la microscopía continúa siendo el punto inicial más rápido en el diagnóstico. En un período de 6 meses se estudiaron 973 muestras por microscopía directa empleando el método de Ziehl-Neelsen para la búsqueda de Bacilos Acido Alcohol Resistentes (B.A.A.R.). En este período se logró identificar 70 (7.2%) baciloscopías positivas y sólo se les practicó cultivo a 18, de las cuales 10 fueron de esputo y 8 de orina, obteniéndose crecimiento en 9 (50%) de esputo, con total negatividad en las de orina y en una muestra de esputo. El tiempo de crecimiento para la mayoría de las cepas fue de 23 días, obteniéndose un máximo de 30 días para una muestra y un mínimo de 21 días para otra.

Las pruebas bioquímicas y pruebas de sensibilidad a drogas antituberculosas fueron realizadas respectivamente para la identificación de las micobacterias aisladas y encontrar la quimioterapia más eficaz para el tratamiento de éstos pacientes. Las pruebas de tipificación bioquímicas (niacina, catalasa y reducción de nitratos) dieron resultados positivos para *M. tuberculosis* en todas las cepas aisladas.

Las pruebas de sensibilidad efectuadas demostraron que el 71% de las cepas eran resistentes a isoniacida y rifampicina, el 28% resistentes a pirazinamida y 14% de las cepas son resistentes a estreptomycinina, etambutol y protionamida, el 100% fueron sensibles a tiacetazona.

Con éste estudio se da la oportunidad a los técnicos laboratoristas y químicos a dar la importancia que requiere el llevar a cabo una buena técnica de tinción para B.A.A.R., así como, su detección por microscopía.

INTRODUCCION.

El género *Mycobacterium* incluye una amplia variedad de especies saprófitas y patógenas, los miembros de éstas últimas causan algunas de las infecciones humanas más importantes como es la lepra y la tuberculosis.

La tuberculosis es una enfermedad cuyo agente causal es *M. tuberculosis*, se considera la patología más común del género humano, ésta enfermedad en un huésped resistente muestra una infección crónica que afecta sobre todo los pulmones, en tanto que el muy susceptible presenta una patología rápidamente mortal, con diseminación generalizada de la enfermedad a varios órganos (1).

La tuberculosis es considerada una enfermedad muy antigua. Fué un problema endémico en animales del período paleolítico y neolítico, es probable que en aquel tiempo el microorganismo infeccioso haya sido *M. bovis* o una variante de él. Referencias de *M. tuberculosis* han sido encontrados en antiguos escritos babilónicos, egipcios y chinos, así como, lesiones de tuberculosis en cuerpos momificados aproximadamente 2,000 A.C. (1,2).

Las primeras manifestaciones de infecciones fueron de seguro hechos aislados debido al consumo de carne infectada, leche contaminada o quizá al contacto que hubo entre el hombre y el ganado.

Cuando el hombre comienza a asentarse en grandes comunidades surgieron condiciones ambientales que alteraron el delicado equilibrio entre el hombre y el bacilo de la tuberculosis, produciéndose cambios ambientales necesarios que desataron epidemias. La epidemia se diseminó lentamente en todo el mundo gracias a la exploración

y colonización, convirtiéndose en un trastorno epidémico al inicio de la Revolución Industrial, alcanzando su máximo en Europa Occidental y Estados Unidos al final del siglo XVIII e inicio del siglo XIX, extendiéndose más adelante a Europa Oriental, Asia, Africa y Sudáfrica (2,3).

Durante el transcurso de la historia se había querido dar una explicación del origen y tratamiento de ésta enfermedad infecciosa. Las aportaciones de Hipócrates y Galeno fueron importantes, más adelante Jéronimo Fracastor, físico florentino, en 1546 aparentemente fué el primero en postular que el contagio se debía a un microorganismo y se transmitía vía fómites. A finales del siglo XVII y principio del siglo XVIII se mencionaba en algunos textos que la enfermedad era causada por mal clima, insuficiente luz y ventilación. Ya en 1865, Jean-Antoine Villemin prueba que la tuberculosis se contagiaba por inyecciones de esputo en animales sanos o por sangre de pacientes tuberculosos (1).

Para 1882, Roberto Koch describió su técnica de tinción para bacterias, utilizando sus postulados identifica al bacilo de la tuberculosis, lo cultiva y produce la enfermedad en animales por inoculación de cultivos y que más tarde proporcionaría un tratamiento eficaz para la tuberculosis con un extracto del microorganismo llamado tuberculina (4,5).

Con el transcurso del tiempo se fueron dando grandes avances en el diagnóstico y tratamiento; ya en 1761, Leopoldo Von Aenbrugger físico, promovió el exámen de tórax. En los años siguientes medidas de seguridad se establecieron entre la población para tener cierto control sobre la enfermedad. En 1885, otros investigadores observaron que cierta bacteria era capaz de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis*. El resultado de otras investigaciones fué la pro-

ducción de una vacuna con la cepa de Bacilos de Calmette-Guérin (BCG). La vacuna se empleo por primera vez en 1921 y ha tenido un amplio uso desde entonces, la vacunación con BCG es recomendada por la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) como parte del extenso programa sobre inmunización para infantes y usada por la mayoría de las ciudades del mundo (6,7,8,9).

Pero no fué hasta 1943 que Selman Waksman aisló *Streptomyces griseus*, el microorganismo que producía la estreptomycin, disponible hasta 1947 como un tratamiento eficaz contra la tuberculosis. De ésta forma prosiguieron otros agentes antituberculosos incluyendo el ácido para-amino salicílico (1949) y la isoniacida (1952), con el descubrimiento de la rifampizina y pirazinamida se proporcionó una mayor efectividad del tratamiento. Así, la tuberculosis podía ser erradicada en muchas ciudades del mundo donde se había desarrollado (2,10,11).

Hoy en día la tuberculosis es todavía un problema mundial, se ha estimado que una tercera parte de la población esta infectada por el bacilo tuberculoso (12,13,14,15,16,17,18,19). El aumento actual de la enfermedad micobacteriana se ha relacionado con diferentes causas: con los pacientes inmunodeprimidos VIH, afluencia de inmigrantes infectados, epidemias de tuberculosis resistente a drogas antituberculosas en lugares congregativos (albergues, cárceles, asilos, hospitales, etc.), sobre todo en poblaciones con bajos recursos económicos y con adicción a drogas por vía intravenosa (20,21,22,23,24,25,26,27). Sin embargo, aún no se ha establecido si la causa principal de éste incremento es la reactivación o la transmisión reciente (28,29,30,31). Por otra parte, se ha sugerido que la infección por VIH, es un importante predictor de la resistencia a los antituberculostáticos, si bien no queda claro por el cual éste virus es capaz de inducir tal resistencia (10,33,34).

La aparición de cepas TB-RMD a dado lugar a perdida de vidas humanas, muchas de esas muertes se dieron antes que se pudiera contar con los datos de laboratorio clínicos referentes a la susceptibilidad farmacológica. El tiempo de semanas o meses que transcurre desde la obtención de la muestra clínica es alarmante. Hasta la fecha, la identificación clásica requiere de tres pasos fundamentales: i) aislamiento de la cepa por cultivo, ii) pruebas de identificación bioquímicas y iii) pruebas de susceptibilidad. Estos dos últimos pasos son igualmente largos y pesados (36,37,38) y una importante ofensiva es el esfuerzo de controlar la epidemia de tuberculosis, la cual se basa en el conocimiento molecular y celular del organismo e interacción del patógeno y el huésped (2,12,39,41,42).

La tuberculosis causada por micobacterias atípicas y lepra representan un grave problema actual, se requieren medidas urgentes para detectar e identificar a estos microorganismos que afectan a millones de personas en el mundo (8,35,43,44,45,46).

Los métodos moleculares para identificación, tipificación de cepas y de susceptibilidad farmacológica, son de gran valor predictivo en el caso de patógenos imposibles de cultivar en medios artificiales, que crecen con lentitud en dichos medios o requieren de gran esfuerzo para ser cultivados en el laboratorio clínico. Las sondas de hibridación del DNA y análisis de longitud del fragmento (RFLP), etc., se emplean en la actualidad para facilitar el diagnóstico y la valoración de la patología micobacteriana. El método de PCR ha evolucionado rápidamente, hasta el punto en que puede convertirse en un procedimiento sistemático en los laboratorios de microbiología clínica.

El aislamiento, la identificación y las propiedades de resistencia farmacológica de la micobacteria se pueden conocer directa--

mente de las muestras clínicas y los resultados están disponibles en cuestión de días y no de semanas o meses. Por lo que se refiere al costo, éstos procedimientos son elevados en la actualidad, pero el costo de los cultivos y susceptibilidad tradicionales, períodos innecesarios de aislamiento para el control de infecciones, retraso en la identificación de cepas resistentes, y muertes que sobrevienen antes de contar con la información del laboratorio contribuyen altos precios (2,14,18,47,48,49,57).

En uno de los intentos por determinar automáticamente el metabolismo bacteriano se introduce el sistema denominado BACTEC 460 TB por Middlebrook y Siddiqui. Este sistema utiliza medio Middlebrook 7H12, conteniendo ácido palmítico como sustrato, marcado con C^{14} , el cual es metabolizado por la bacteria en su crecimiento, liberando al C^{14} en forma de CO_2^{14} el cual es registrado y detectado como índice de crecimiento (IC). Una ventaja principal del sistema es su rapidez, además es sensible para obtener resultados del cultivo y pruebas de sensibilidad. Aunque sus inconvenientes hacen que el sistema sea restringido en su uso (8,50,51).

Sí bien, los procedimientos para pruebas micobacteriales, cultivos y pruebas de susceptibilidad a drogas han sufrido cambios radicales en los últimos años, algunos laboratorios han sido incapaces para incorporar éstas metodologías, mientras tanto, el diagnóstico clínico es realizado por microscopía y confirmado por cultivo. Aunque el diagnóstico definitivo de la tuberculosis radica en el aislamiento e identificación de *M. tuberculosis*, la microscopía de B.A.A.R. es el punto inicial para el diagnóstico, es el procedimiento más simple y más comunmente disponible para detectar la presencia de éste tipo de bacilos en muestras clínicas

Existen dos tipos de tinciones Acido-Resistentes que son comunemente usadas. El primer tipo es una tinción con fucsina básica (metodo de Ziehl-Neelsen o Kinyoun) combinado con el microscopio de luz. El exámen requiere un promedio de 15 minutos, 200-300 campos necesitan ser observados antes que la tinción sea calificada como negativa. El segundo tipo es una tinción con un colorante fluorocrómico (auramina O), el cual presenta ciertas ventajas sobre el primero, como es la facilidad de la lectura, pués los bacilos fluorescentes-luminosos son más fáciles de detectar que los bacilos rojos teñidos con fucsina sobre el fondo azul después de la tinción de Ziehl-Neelsen o Kinyoun. Además puede ser examinada una gran área de la tinción fluorescente, reduciendo el tiempo y esfuerzos requeridos para obtener resultados seguros o confiables, sin embargo, existen desventajas que hacen que su uso sea limitado, como lo es su costo y el adiestramiento del personal para la realización de la técnica, empleo de microscopio fluorescente. No obstante, la tinción con fucsina básica es una tinción muy rápida, simple, de bajo costo y con un razonable valor predictivo. Por lo que la microscopía es una herramienta muy importante para la detección de casos de tuberculosis (21,37,38,47,48,49,53,54). El aislamiento de micobacterias de esputo y de otros especímenes clínicos representan un problema especial para el laboratorio.

La recuperación de micobacterias de los medios de cultivo fué pobre en los primeros intentos, a fines del siglo XIX. Sin embargo, se observó que un medio de cultivo con huevos enteros, harina de papa, glicerol y sales era efectivo para el aislamiento de micobacterias. Más tarde se vió que el verde de malaquita o el cristal violeta ayudaba a controlar las bacterias concomitantes en los medios condensados. En la actualidad se utilizan numerosos medios a base de huevo, de los cuales el más común es el de Löwenstein-Jensen (55).

El manejo de muestras de cultivo expone al laboratorio a un peligro importante de contaminación, por lo tanto, las medidas de seguridad son esenciales. El tomar medidas de bioseguridad pertinentes es sumamente importante, debido a que la incidencia de tuberculosis en aquellos que trabajan con *M. tuberculosis* en un laboratorio, es tres veces mayor que la incidencia entre el personal de laboratorios que no trabajan con la bacteria (21,36,39,56).

El presente trabajo tuvo como objetivos realizar la detección de casos con infección micobacteriana con el tratamiento de muestras de tipo pulmonar y extrapulmonar por microscopía utilizando el método de Ziehl-Neelsen y ratificar el diagnóstico presuntivo con el cultivo efectuado en muestras que resultaron frotis B.A.A.R. positivos.

Con cifras tan altas en el mundo entero y la importancia de las micobacterias en la actualidad, se ha estimado que todos los profesionistas que se encuentran al cuidado de la salud y no sólo los especialistas del aparato respiratorio deben estar preocupados por el diagnóstico de la tuberculosis. En este sentido al igual que en otra época se usó la radiología y todos los médicos sabían interpretarla, hoy la O.M.S. recomienda el uso de la bacteriología y su interpretación adecuada. Así mismo, el personal auxiliar de salud pública debe saber llevar a cabo el método más fácil de diagnóstico de presunción, como es la microscopía. Igualmente los bacteriólogos de todos los hospitales generales y centros de salud y no sólo los establecimientos antituberculosos deben estar capacitados en microbiología para contribuir de manera eficaz contra esta enfermedad.

Mycobacterium tuberculosis

A. CARACTERISTICAS DEL BACILO.

Mycobacterium tuberculosis, produce la tuberculosis en el hombre. Es un bastón delgado, recto o ligeramente curvo, con extremos redondeados. El microorganismo varia en ancho de 0.2 a 0.5 um y en longitud de 1 a 4 um. Es un bacilo aerobio, inmóvil, no formador de esporas y no capsulado, se consideran grampositivos. Es el prototipo de micobacterias acidorresistentes de crecimiento lento (55,64).

B. CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO.

Su producción y multiplicación esta en razón directa de las condiciones naturales del huésped. En condiciones óptimas donde encuentra tensión parcial de oxígeno, temperatura de 37°C, nutrientes, humedad, pH de 6.8-7, el metabolismo es muy activo y el crecimiento progresivo. Las micobacterias son aerobias estrictas y derivan su energía de la oxidación de muchos compuestos sencillos de carbono, el aumento de la tensión de CO₂ estimula el crecimiento. Su velocidad de crecimiento es mucho más lenta que la de la mayoría de las bacterias. El tiempo de duplicación del bacilo tuberculoso es de 12 a 24 horas (2,43,61). El crecimiento del bacilo en medios de cultivo con base de huevo logra su máximo desarrollo después de 2-3 semanas de incubación a 37°C (55).

C. MEDIOS DE CULTIVO.

La mayor parte de las micobacterias logran su desarrollo en medios simples, que contienen una fuente de carbono (glucosa, glicerol, ácidos grasos), una de nitrógeno (amoníaco, amidas, aminoácidos como glicina, alanina) e iones de metales que incluyen hierro o magnesio. El uso de anilinas (verde de malaquita y cristal violeta) ayuda a controlar las bacterias contaminantes (5,64,65).

a) Medios No Selectivos.

En la actualidad se utilizan numerosos medios sobre la base de huevo para el aislamiento de micobacterias. El más común es el medio de Löwenstein-Jensen, existen otros como el medio de Petrag-nani, el medio de American Thoracic Society (ATS), el Middlebrook 7H9, 7H10, 7H11, 7H12. El Dubos, Coletsos, Stonebrink, Muller-Hinton.

b) Medios Selectivos.

Durante años se han utilizado medios de cultivo con contenido de agentes antimicrobianos para suprimir la contaminación bacteriana y fúngica. Aunque ciertos agentes antimicrobianos reducen la contaminación, también pueden inhibir el crecimiento de las micobacterias. Ejemplo de éstos medios es el de Löwenstein-Jensen modificado por Gruft, el Mitchison (Middlebrook 7H11 selectivo).

D. IDENTIFICACION.

M. tuberculosis puede ser identificado usando unas pocas pruebas simples (temperatura óptima y tiempo promedio de crecimiento, producción de pigmento, acumulación de niacina, reducción de nitratos, actividad catalasa, inhibición del crecimiento por la hidracida del ácido carboxílico-2-tiofeno (T₂H). Es importante establecer un grupo de pruebas de detección a fin de establecer la diferencia de **M. tuberculosis** con otras micobacterias (65).

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LAS MICOBACTERIAS

	Temperatura de aislamiento óptimo y tiempo de crecimiento		Pigmentación creciendo en		Prueba de nitrato	Reducción de nitratos	Hidrólisis de Tween 80:10
			Luz	Oscuridad			
<i>M. tuberculosis</i>	37°C	12-25 días	Ante	Ante	+	+	V
<i>M. africanum</i>	37°C	31-42 días	Ante	Ante	V	V	-
<i>M. bovis</i>	37°C	24-40 días	Ante	Ante	V	-	-
<i>M. ulcerans</i>	37°C	28-61 días	Ante	Ante	-	-	-
<i>M. kansasii</i>	37°C	10-20 días	Amarillo	Ante	-	+	+
<i>M. marinum</i>	30°C	5-14 días	Amarillo	Ante	+	-	-
<i>M. simiae</i>	37°C	7-14 días	Amarillo	Ante	+	-	-
<i>M. asiaticum</i>	37°C	10-21 días					
<i>M. szulgai</i>	37°C	12-25 días	Amarillo a naranja	Amarillo: 37°C Ante: 25°C	-	+	V
<i>M. scrofulaceum</i>	37°C	+10 días	Amarillo	Amarillo	-	-	-
<i>M. goodii</i>	37°C	+10 días	Amarillo a naranja	Amarillo	-	-	+
<i>M. flavescens</i>	37°C	7-10 días	Amarillo	Amarillo	-	+	+
<i>M. xenopi</i>	42°C	14-28 días	Amarillo	Amarillo	-	-	-
Complejo <i>M. avium</i>	37°C	10-21 días	Ante a amarillo pálido	Ante a amarillo pálido	-	-	-
<i>M. haemophilum</i>	30°C	14-21 días	Gris	Gris	-	-	-
<i>M. malmoense</i>	37°C	21-28 días	Ante	Ante	-	-	+
<i>M. gastri</i>	37°C	10-21 días	Ante	Ante	-	-	+
Complejo <i>M. terrae</i>	37°C	10-21 días	Ante	Ante	-	V	+
<i>M. triviale</i>	37°C	10-21 días	Ante	Ante	-	+	+
<i>M. fortuitum</i>	37°C	3-5 días	Ante	Ante	-	+	V
<i>M. chelonae</i>							
supesp. <i>chelonae</i>	28°C	3-5 días	Ante	Ante	V	-	V
supesp. <i>abscessus</i>	35°C	3-5 días	Ante	Ante	-	-	V
<i>M. smegmatis</i>	37°C	3-5 días	Ante a amarillo	Ante a amarillo	-	+	+

V = variable; espacios blancos: pocos o ningún dato.

(Cont.) CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LAS MICOBACTERIAS

	Catalasa					Crecimiento en			
	Semi- cuan- tati- vo	pH 7.0 68°C	Aril- sulfa- tasa 3 días	Urea- sa	Pirazi- namida- sa	Capta- ción de hierro	T ₂ H 1 g/ml	5% NaCl 28°C	Agar de MacConkey
<i>M. tuberculosis</i>	< 45	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>M. africanum</i>	> 45	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. bovis</i>	< 45	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>M. ulcerans</i>	> 45	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. kansasii</i>	> 45	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>M. marinum</i>	> 45	-	V	+	+	-	+	-	-
<i>M. simiae</i>	> 45	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>M. asiaticum</i>	> 45	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. szulgai</i>	> 45	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	> 45	+	-	+	V	-	+	-	-
<i>M. gordonae</i>	> 45	+	-	-	V	-	+	-	-
<i>M. flavescens</i>	> 45	+	-	+	+	-	+	V	-
<i>M. xenopi</i>		+	+	-	+	-	+	-	-
Complejo <i>M. avium</i>	< 45	+	-	-	+	-	+	-	V
<i>M. haemophilum</i>	< 45	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>M. malmoense</i>	< 45	V	-	V	V	-	+	-	-
<i>M. gastri</i>	< 45	-	-	+	-	-	+	-	-
Complejo <i>M. terrae</i>	> 45	+	+	-	V	-	+	-	V
<i>M. triviale</i>	> 45	+	V	-	V	-	+	-	-
<i>M. fortuitum</i>	> 45	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. chelonae</i>									
spp. <i>chelonae</i>	> 45	+	+	+	+	-	+	-	-
Spp. <i>abscessus</i>	> 45	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>M. smegmatis</i>	> 45	+	-	-	-	+	+	-	-

V = variable; espacios blancos: pocos o ningún dato.

REFERANCIA BIBLIOGRAFICA: 65.

E. EPIDEMIOLOGIA.

La tuberculosis en la actualidad es un problema a nivel mundial, se estima que una tercera parte de la población mundial es infectada por *M. tuberculosis* (2,19).

En México la tuberculosis es un problema de salud pública, se encuentra dentro de las primeras causas de mortalidad en varios grupos de edad. Hay alrededor de 30,000 casos nuevos de tuberculosis cada año, un dato importante, es que la Red Nacional de Laboratorios de la Secretaría de Salud, muestra que en más del 50% de los casos se diagnóstican con baciloscopías positivas son ++ y +++, lo cual indica que estos enfermos han tenido una larga evolución (22,23).

Proyecciones recientes, indican que la incidencia de tuberculosis puede esperarse a incrementar a 8.8 millones de casos anualmente, 10.2 millones de casos para el año 2,000 y 11.9 millones para el año 2,005. Asumiendo que la disponibilidad y efectividad del programa de tratamiento permanescan en el nivel de 1990, 3 millones de muertes por tuberculosis se esperaron en 1995 y 3.5 millones de muertes pueden ser esperados para el año 2,000. Las ciudades y territorios supervisados por la O.M.S. desde 1992 han adoptado las estrategias reglamentadas por éste organismo y 23 ciudades en desarrollo están logrando los objetivos planteados por la O.M.S., el obstáculo mayor para hacer progresos más rápidos, permanecen limitados a los recursos financieros disponibles para el control de la tuberculosis global (12,13,14,15,18,19,20,21).

F. PATOGENIA.

La infección más común en el hombre consiste por la inhalación de aire con partículas que contienen bacilos con acceso al alvéolo pulmonar (2,40,62,67).

La infección pulmonar producida por los microorganismos inhalados depende de la virulencia de la bacteria y de la capacidad antimicrobial del macrófago alveolar que lo ingiere (2). Riley W.L., menciona que la suerte intracelular de *M. tuberculosis* puede ser dividido en dos fases: i) la fase temprana (a pocas horas después de su entrada), el microorganismo puede vencer una multitud de procesos antimicrobiales del macrófago, ii) aquellos organismos que sobreviven a éste ataque inicial ingresan a una fase de latencia (41).

No es muy claro cual de las estrategias de evasión de la respuesta inmune es empleada por *M. tuberculosis*. Generalmente se creó que la muerte e inhibición del crecimiento de patógenos intracelulares, en fagocitos mononucleares es dependiente de fusión fagolisosoma.

Estudios de Armstrong y D' Arcy Hart, indicaron que los bacilos tuberculosos virulentos (H37Rv) pueden inhibir la fusión del fagolisosoma y que el patron de fusión de macrófagos infectados con bacilos tuberculosos es afectado por la presencia de componentes séricos en el tiempo de infección. Con respecto a esto último, ha sido demostrado que *M. tuberculosis* puede entrar al macrófago a través de receptores del complemento CR₁ y CR₃. Posteriormente estudian a macrófagos de ratón infectados con el bacilo, después de grandes períodos de tiempo, observaron que cepas H37Rv y cepas avirulentas (H37Ra), permanecían viables dentro del macrófago precisamente después de 8-16 días, la cepa BCG moría después de 15 días.

Realizaron el tratamiento de los microorganismos con antisuero anti BCG y demostraron que las cepas H37Rv internadas en vacuolas fusionadas a los lisosomas no eran afectadas, sin embargo, quedan habilitadas para sobrevivir bajo éstas condiciones. Lo anterior fué recientemente demostrado por McDonough y et al., pero los bacilos se encontraban en el interior del fagolisosoma 2-6 horas después de la infección. En 4 días o más, muchas cepas H37Rv y H37Ra escaparon de la fusión de fagosomas vía vesículas, mientras que BCG y cepas H37Rv y H37Ra termolábiles no lo hicieron (40,41).

Existen otros mecanismos por los cuales *M. tuberculosis* puede sobrevivir a la fase temprana de la infección, como es la inhibición de la acidificación del fagosoma, ésta puede ser una estrategia de supervivencia general para muchos patógenos intracelulares. Sin embargo, el pH bajo tiene mínimo efecto en el crecimiento del bacilo tuberculoso in vitro, lo cual incrementa la susceptibilidad del organismo a antimicrobiales del macrófago tal como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los macrófagos activados producen enzimas y sustancias tóxicas como el H_2O_2 , para matar el microorganismo que ingieren. Las enzimas como la fosfatasa ácida y lisozima atacan la pared celular, se producen ácidos grasos que inhiben la proliferación de la micobacteria. Es probable que los mecanismos oxidativos y no oxidativos participen en la muerte de la micobacteria, causado por los macrófagos activados (2,41).

Lowrie, demostró que las concentraciones de adenosin monofosfato cíclico (AMP) dentro de los fagosomas, protege a algunas micobacterias de ser ingeridas. Mientras Crowle, demuestra que algunas evitan la digestión por bombeo de iones amoníaco en el espacio vecino inmediato del microorganismo (5).

Más recientemente, algunos investigadores han reportado que intermediarios de nitrógeno reactivo (RNI), son producidos por macrófagos activados de ratón y son las principales moléculas efectoras antimicrobiales (41).

Si el bacilo puede sobrevivir a estos mecanismos de defensa iniciales, entonces se reproduce dentro del macrófago alveolar. El bacilo tuberculoso crece con lentitud, básicamente sin impedimento hasta que sobreviene una reacción inmune celular dentro de 4 a 8 semanas. Aparece una reacción inflamatoria hasta que alcanza un número umbral de *M. tuberculosis*. Esta reacción inflamatoria se asocia con la diseminación del bacilo por los ganglios hiliares o por el torrente sanguíneo (2).

La respuesta inflamatoria no específica, evocada con la primera exposición a bacilos tuberculosos se torna granulomatosa, con la agregación de grupos de células T activadas y macrófagos alrededor del sitio de infección. Frecuentemente continúa hasta que una célula gigante es formada, este es el clásico tubérculo o granuloma que contiene células epitelioides y linfoides, todo un collar de macrófagos, fibroblastos y linfocitos que rodean al granuloma (2, 62). La formación del tubérculo puede tal vez, verse como la culminación de la quimiotaxis de muchos macrófagos (67).

Con frecuencia, la región central de células epitelioides sufre necrosis caseosa, característica para producir un tuberculo --blando. Cuando la carga antigénica en el sitio de la infección inicial y ganglios linfáticos regionales es grande, se produce necrosis caseosa y luego calcificación. Estas lesiones calcificadas en el sitio primario, se denominan Complejo Primario de Ghon (2,5,62).

Luego del desarrollo de hipersensibilidad, la infección se torna inactiva y asintomática en la mayoría de los pacientes.

La lesión pulmonar puede continuar creciendo y ocasionar neumonia en el parenquima circulante y extenderse hacia la pleura. El centro caseoso puede licuarse y vaciarse hacia un bronquio, determinando la formación de una caverna (cavitación primaria) y de nuevas áreas neumónicas. La cavitación se debe a la liberación de mediadores inmunitarios y por lo tanto suele presentarse cuando la inmunidad celular se encuentra activa (2).

La diseminación hematógica ocurre con mayor frecuencia durante la fase de caseificación y produce lesiones miliares diseminadas que pueden afectar ojos, pulmones, huesos, cerebro, riñones, hígado o bazo. También pueden existir focos tuberculosos en órganos aislados, como consecuencia de bacilemia, antes que se desarrolle la hipersensibilidad y pueda diseminarse directamente a través de los ganglios linfáticos regionales o el conducto tóraxico. Estos ganglios tienen tendencia a cicatrizar espontáneamente, pero los bacilos tuberculosos pueden persistir durante años en las áreas de calcificación (65).

La mayor parte de las complicaciones de la tuberculosis primaria aparecen durante el primer año que sigue al inicio de la infección. En un bajo número de pacientes, cuya infección tuberculosa inicial cede, produce enfermedad secundaria, a pesar de la presencia de inmunidad celular adquirida (2).

G. MANIFESTACIONES CLINICAS.

a) Tuberculosis Pulmonar Primaria.

La enfermedad es asintomática en la mayoría de los casos o bien la sintomatología es muy pobre y se puede confundir con una infección en las vías respiratorias superiores. Cuando hay síntomas, se presenta fiebre de predominio vespertino de una a dos semanas de duración, asociado con signos de infección en las vías respiratorias superiores, falta de apetito y debilidad. En casos avanzados puede encontrarse neumonía, bronquitis y derrame pleural. La piel y la conjuntiva también pueden ser sitios de infección primaria (61,63,64,65).

b) Tuberculosis Pulmonar Crónica.

Es la forma más frecuente de tuberculosis en el adolescente y en el adulto. El paciente presenta anorexia, pérdida de peso, fiebre vespertina, cansancio y tos. El exámen clínico de los campos pulmonares puede ser normal o revelar estertores alveolares en las zonas apicales. La hemoptisis del adulto rara vez ocurre en el niño y el adolescente. El dolor torácico también puede ser notable en la enfermedad crónica tardía (64,65,68).

c) Tuberculosis Extrapulmonar.

Este tipo de tuberculosis es producida cuando los bacilos tuberculosos han llegado a los linfáticos y torrente sanguíneo y se depositan en órganos alejados. Los sitios donde más frecuentemente se desarrolla una infección tuberculosa progresiva que se produce en la ausencia de una respuesta inmunológica adecuada son los huesos y articulaciones, vías genitourinarias, meninges, ganglios linfáticos y peritoneo. La tuberculosis extrapulmonar inicial es muy poco frecuente y puede adquirirse por la ingestión del bacilo bovino, con localización en la mucosa bucal o en el intestino (61,63, 65,68).

H. DIAGNOSTICO.

a) Manifestaciones Clínicas.

Las manifestaciones clínicas sugestivas de la enfermedad son de gran valor diagnóstico. Los pacientes tuberculosos deben someterse a una historia clínica muy completa.

Otros datos de ayuda para el diagnóstico lo constituye el antecedente epidemiológico de contacto con el enfermo tuberculoso, debiéndose realizar el estudio exhaustivo del núcleo familiar.

b) Radiografía de Tórax.

Los principales hallazgos radiológicos pulmonares son los infiltrados neumónicos, las adenopatías mediastinales, las cavernas, los infiltrados miliare, el derrame pleural y las calcificaciones.

c) Prueba Tuberculínica.

Esta prueba es el prototipo de la hipersensibilidad tardía producida por una respuesta inmune mediada por células y es de gran ayuda en el diagnóstico, ya que una reacción positiva indica la presencia de infección tuberculosa.

d) Microscopía.

En muchas partes del mundo las limitaciones hacen posible hacer un examen microscópico de esputo no procesado. Además, permite hacer un diagnóstico preliminar, rápido y útil, tiene una función importante en los programas de control de la tuberculosis ya que la transmisión de la enfermedad se debe principalmente a pacientes cuya expectoración tiene tantos microorganismos que son detectables por microscopía directa de frotis de esputo (5,52).

e) Cultivo.

El diagnóstico de certeza de tuberculosis sólo puede hacerse mediante el cultivo de *M. tuberculosis*, utilizando material biológico diverso: exudado traqueal, jugo gástrico, líquido pleural,

peritoneal o cefalorraquídeo, etc. Se requieren de 2 a 3 semanas para obtener un cultivo positivo, éste tiempo es mayor si se utiliza el tradicional medio de Löwenstein-Jensen.

Todas las muestras clínicas sospechosas de contener micobacterias, pueden ser cultivadas por dos razones: i) el cultivo es mucho más sensitivo que la microscopía y ii) el crecimiento de organismos es necesario para la identificación precisa de la especie (25,50).

f) Sistema Radiométrico.

Tal vez, el sistema radiométrico más usado para detectar el crecimiento temprano de micobacterias en cultivo, es el sistema BACTEC. La introducción del sistema ha proporcionado crecimiento más rápido (promedio de 9 días), identificación específica de *M. tuberculosis* (5 días) y pruebas de susceptibilidad a drogas (6 días). No obstante, ésta tecnología no puede reemplazar completamente los métodos micobacteriológicos clásicos, pero si es una herramienta de gran valor (50,51).

g) Pruebas Genéticas.

El uso de la tecnología genética ofrece grandes avances en el diagnóstico de ésta enfermedad. Existen diferentes pruebas como son: sondas de hibridación del DNA, polimorfismo de restricción del fragmento (RFLP), reacción de la cadena polimerasa (PCR), reacción de la cadena ligasa, análisis de informador luciferasa (35,48,49,57).

Existen otras técnicas que se emplean para el diagnóstico de tuberculosis, tal como son la detección de antígenos micobacteriales por ELISA y RIA, detección de componentes celulares (ácido tuberculosteárico TSA) por cromatografía de gases- espectrometría de masas (GC-MS) (8,69).

I. TRATAMIENTO.

Se dispone de cuatro drogas antituberculosas de primera línea (isoniacida, rifampicina, estreptomina y etambutol) y cierto número de agentes de segunda línea (pirazinamida, cicloserina, etionamida, ácido para-aminosalicílico, viomicina, amikacina, kanamicina, capreomicina y tiacetazona) (10,30,66).

Una de las principales estrategias con el fin de lograr mayor control de los pacientes y así acortar la cadena de transmisión de la enfermedad, tal vez, una de las estrategias más recientes sea la administración de tres medicamentos en una sola tableta (combinación fija: isoniacida, rifampicina y pirazinamida). El uso de la combinación fija aumenta el cumplimiento, evita la monoterapia y en consecuencia la aparición de resistencia secundaria (44).

Existen diferentes esquemas de tratamiento, pero el arma más poderosa disponible contra la tuberculosis es la quimioterapia de corta duración. Consta de dos fases: i) fase intensiva, con duración de dos meses, los pacientes tuberculosos son tratados con cuatro drogas (rifampicina, isoniacida, pirazinamida y etambutol), para asegurar que mutantes resistentes a una droga puedan emerger y ii) fase de sostén, en los siguientes cuatro meses, con administración solamente de rifampicina e isoniacida, para matar a algún microorganismo resistente.

Estos esquemas de corta duración permiten ser supervisados directamente por el personal de salud, además mientras menor sea la cantidad de fármacos requeridos y más breve sea la duración del tratamiento, más conveniente resultará para el paciente y habrá más probabilidades que éste coopere, además que tiene un menor riesgo de toxicidad crónica (2,10,44).

OBJETIVOS.

- Detectar micobacterias por microscopía en muestras de tipo pulmonar y extrapulmonar aplicando la tinción para Bacilos Acido Alcohol Resistentes (B.A.A.R.) con el método de Ziehl-Neelsen.

- Comprobar el diagnóstico presuntivo realizado por microscopía con la realización del cultivo.

- Determinar la especie de micobacterias aisladas de los cultivos, mediante las pruebas de tipificación bioquímicas (niacina, catalasa y reducción de nitratos).

- Efectuar las pruebas de sensibilidad a drogas en cepas de micobacterias aisladas.

MATERIAL Y METODOS.

Se analizaron 973 muestras clínicas de tipo pulmonar y extrapulmonar. Las cuales fueron obtenidas de pacientes del Hospital General Regional de Zona N° 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social.

a) MATERIAL BIOLÓGICO:

Nº de muestras	Tipo de muestra.
390	Espuito
495	Orina
47	Heces
8	Líquido pleural
6	L.C.R.
6	Esmegma
5	Líquido seminal
5	Líquido ascítico
4	Jugo gástrico
1	Líquido articular sinovial
1	Líquido bronquial
1	Líquido peritoneal
1	Raspado ótico derecho
1	Raspado ótico izquierdo
1	Raspado corneal izquierdo

b) CEPAS DE REFERENCIA UTILIZADAS.

Cepa H37Ra de *M. tuberculosis*.

Cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.

c) MEDIO DE CULTIVO.

Medio de Löwenstein-Jensen.

d) MATERIAL DE VIDRIO.

Tubos de ensayo de 12 x 100 mm.

Tubos de ensayo de 16 x 125 mm.

Tubos de centrifuga de 50 ml.

Pipeta graduada de 1 ml.

Pipeta graduada de 5 ml.

Tubos de ensayo con medio de Löwenstein-Jensen y tapón de algodón.

Matraz Erlenmeyer de 2 lt.

Matraz volumétrico de 1 lt.

Probeta graduada de 100 ml.

Portaobjetos (ERIE) de 75 x 25 mm.

Frasco de boca ancha color ambar para fenol.

Frascos para colorantes.

Frasco para agua.

e) EQUIPO.

Gradillas

Mechero

Aplicadores de madera

Agitador automático

Aceite de inmersión

Archivador de frotis

Cabina de seguridad

Caballote de varillas

Balanza

Estufa bacteriológica (Matsa-Quebs) de 35-37°C.
Embudos con filtros de papel
Hisopo metálico para flamear
Lapiz diámante
Microscopio óptico (Zeiss)
Refrigerador a 4°C
Centrífuga a prueba de aerosoles
Pinzas
Xilol
Repisa de madera
Balanza granataria

f) REACTIVOS.

Hidróxido de sodio (LAITZ)
Acido clorhídrico (P.Q.M.)
Fenol (Baker)
Agua destilada

g) COLORANTES.

Fucsina básica (Merck)
Azul de metileno (Merck)
Rojo de fenol (Sigma)

TINCION DE B.A.A.R.

Método de Ziel-Neelsen.

Fundamento:

Debido a su alto contenido lípidico, las paredes celulares de las micobacterias tienen la capacidad única de ligarse a la fucsina, no siendo decoloradas por el alcohol-ácido.

Técnica:

Preparación del Extendido (Frotis).

- a) Se rótula la lámina o cubreobjetos para su perfecta identificación.
- b) Con un palillo de madera se deposita la muestra más porulenta en el portaobjetos y se extiende de manera uniforme, eliminando los restos más gruesos de la muestra. Siempre trabajando detrás de la flama del mechero.
- c) Los palillos se desechan en un recipiente con una solución de fenol al 5%.
- d) Fijar cada lámina con el extendido hacia arriba, pasandola dos o tres veces sobre la llama y se colocan sobre una repisa los frotis ya fijados.

Coloración.

- a) Los frotis se colocan en orden numérico, sobre el caballete de vidrio, dispuestos sobre la tina metálica de coloración.
- b) Se cubre la superficie del extendido con fucsina fenicada (filtrada).
- c) Con la llama de un hisopo de algodón humedecido con alcohol, calentar suavemente por debajo de las láminas cubiertas con

fucsina, hasta que se produzca la emisión de vapores blanquesino visibles, dejar de calentar y repetir la operación por dos veces o más. No permitir que el calentamiento llegue a ebullición o que la fucsina se seque, en éste último caso reponer el colorante. La operación lleva aproximadamente 5 minutos.

- d) Eliminar la fucsina tomando el frotis con una pinza, inclinandola hacia adelante.
- e) Lavar con agua a baja presión y decantar.

Decoloración.

- a) Se cubre el extendido con alcohol-ácido.
- b) Se lava con agua, cuando la solución decolorante adquiere una coloración roja se lava con agua y si es necesario se decolora nuevamente.
- c) Eliminar el alcohol-ácido, lavando la lámina con agua a baja presión. El proceso dura alrededor de 2 minutos.

Coloración de Contraste.

- a) Se cubre la superficie de la laminilla con azul de metileno durante un minuto.
- b) Se decanta el azul de metileno, se lava el portaobjetos con agua a baja presión, tanto en su superficie como en la cara inferior.
- c) Se dejan secar a temperatura ambiente, colocandolos en forma vertical en una repisa de madera.

Observación al Microscopio.

- a) Se utiliza un microscopio con objetivo de inmersión (100x) y ocular de 8x o 10x.
- b) Limpiar perfectamente los oculares, colocar una gota de aceite de inmersión en el extendido y enfocar al microscopio con el objetivo 100x y ajustar con el tornillo micrométrico.
- c) Dividir cada campo mentalmente en cuatro cuadrantes. Iniciar la lectura en el cuadrante superior derecho y se continúa con los otros en el sentido de las manecillas del reloj.
- d) La lectura sobre el extendido debe ser de izquierda a derecha con la observación de un mínimo de 100 campos microscópicos útiles.
- e) Terminada la observación se limpia el aceite de inmersión del objetivo con papel suave o gasa, absorbiendo el aceite sin frotar la superficie del lente.
- f) El frotis observado se sumerge en xilol, se escurre para eliminar el aceite y se archiva.

DECONTAMINACION DE MUESTRAS PARA CULTIVO.

Método de Petroff.

Este método se basa en el lavado del sedimento de la muestra con un tratamiento de hidróxido de sodio y rojo de fenol al 4%, neutralizado con ácido clorhídrico 1 N.

Método:

- a) Trabajar frente a la llama del mechero o en un gabinete de seguridad.
- b) La muestra colocarla en un tubo con tapón de rosca y verter un volumen igual de NaOH con rojo de fenol al 4%.
- c) Agitar por 20 segundos con un agitador automático.
- d) Incubar a 37°C por 15 minutos.
- e) Centrifugar a 3,000 r.p.m. por 15 minutos.
- f) Eliminar el sobrenadante en un frasco con fenol al 5%.
- g) Neutralizar el sedimento con ácido clorhídrico 1 N.

CULTIVO.

- a) Con una pipeta Pasteur tomar el neutralizado y depositar en cada tubo con medio de Löwenstein-Jensen aproximadamente 6 gotas. Cada muestra debe sembrarse por duplicado.
- b) Colocar los medios de cultivo en posición inclinada sobre cajones especiales, manteniendo un poco flojo el tapón del algodón.
- c) Revisar a las 48 hrs. Si el líquido neutralizado se evapora, ajustar el tapón, asegurarlo con una tapa de polietileno y con una liga después de quemar el tapón de algodón.
- d) Colocar los cajones en la estufa a una temperatura de 37°C.
- e) Seguir revisando los cultivos periódicamente a los 7, 30 y 63 días para ver si hay crecimiento.

PRUEBAS DE TIPIFICACION.

Prueba de Niacina.

Fundamento:

En la prueba química para la niacina, el ácido nicotínico reacciona con el bromuro de cianógeno en presencia de una amina primaria (anilina) para formar un compuesto amarillo.

Método:

- a) A un cultivo con abundantes colonias de no menos de cuatro semanas de desarrollo, agregar 1 ml. de agua destilada estéril.
- b) Romper el medio con el asa, dejar el tubo inclinado durante 15 minutos.
- c) Colocar nuevamente el tubo en posición y tomar el líquido con una pipeta provista de propipeta, pasarlo a un tubo limpio y agregar 0.5 ml. de la solución de bromuro de cianógeno y 0.5 ml. de la solución de anilina.

Controles:

Control positivo: *M. tuberculosis*

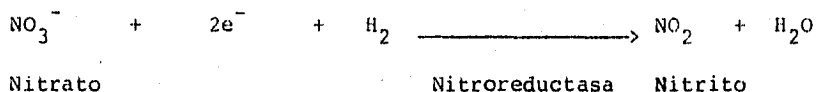
Control negativo: Sólo reactivos.

Prueba de Nitratos.

Fundamento:

Algunas micobacterias pueden utilizar los nitratos como fuente de nitrógeno, reemplazando a las sales de amonio.

Las micobacterias que contienen nitroreductasa catalizan la reducción química siguiente:



la presencia de nitrito en el medio de prueba es detectada por el agregado de los reactivos sulfanilamida y N-naftiletilendiamina. Si hay nitrito, se forma color rojo diazonio.

Método:

- a) Colocar 3 gotas de agua destilada en tubos de 16 x 125 mm con tapa rosca.
- b) Introducir un asa bien cargada de masa bacilar en cada tubo tratando de homogenizar la mezcla.
- c) Agregar 2 ml. del sustrato. Agitar e incubar a 37°C por 24 horas.
- d) Agregar 1 gota de solución Nº 1 y agitar con la mano.
- e) Adicionar dos gotas de solución Nº 2.
- f) Añadir dos gotas de solución Nº 3.

Soluciones:

- Nº 1. HCl 1:2 agregar 10 ml. de HCl concentrado a 10 ml de agua destilada.

Nº 2. Sulfanilamida al 0.2%.

Nº 3. Hidrocloruro de N-naftiletildiamina al 0.1%.

Controles:

Control positivo: M. tuberculosis

Control negativo: Sólo reactivos.

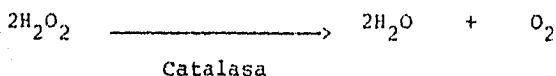
Lectura e interpretación:

Si se desarrolla color rojo en 30 a 60 segundos la prueba es positiva. El color puede variar desde el rosado al rojo intenso (de 1+ a 5+). Se debe comparar el color con el tubo del control negativo.

Prueba de Catalasa.

Fundamento:

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



Método:

- a) Distribuir en tubos de aproximadamente 12 x 100 mm, 0.5 ml. de la solución amortiguadora pH 7 por tubo. Emplear 2 tubos para cada cepa.
- b) Agregar a cada uno de ellos el contenido de una asa cargada de colonias. Dejar uno a temperatura ambiente, colocar el otro tubo en baño maría a 68°C por 20 minutos.
- c) Retirar y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- d) Preparar una mezcla en partes iguales de la solución de Tween 80 y peróxido de hidrógeno, agregar de éste reactivo 0.5 ml a cada tubo. Esta mezcla debe ser preparada en el momento de ser usada.

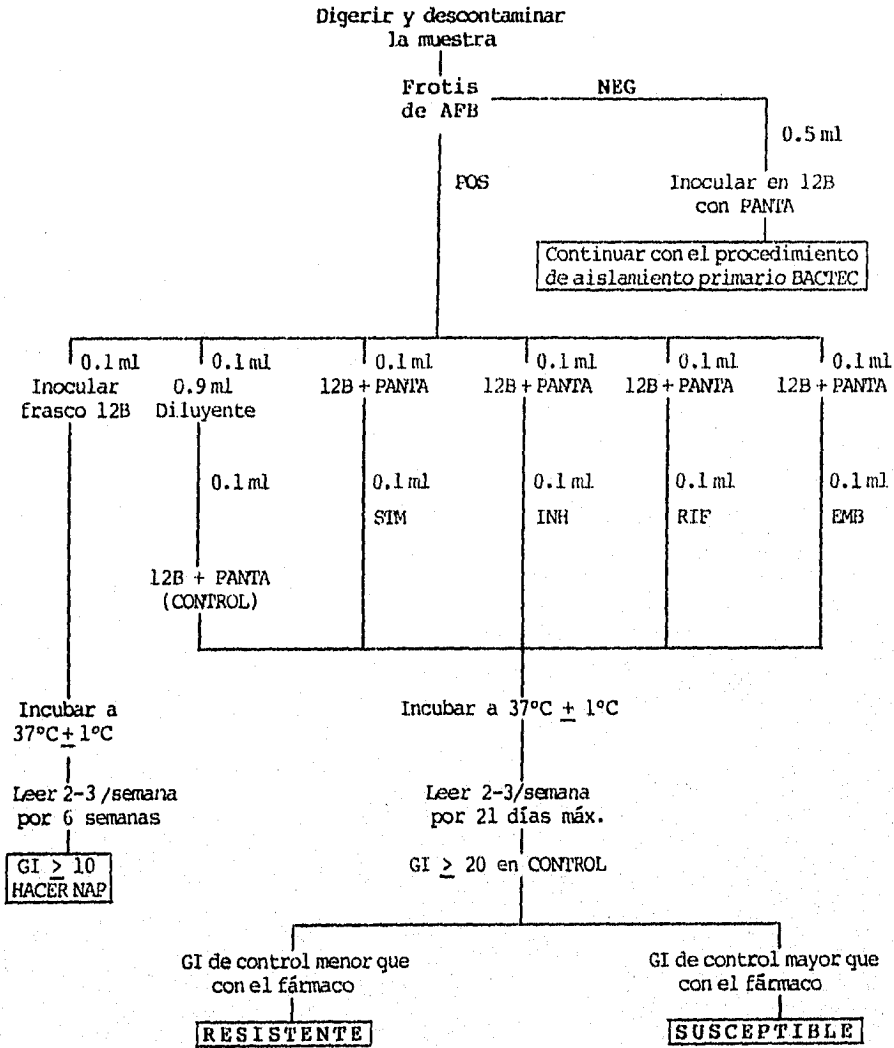
Controles:

Se hace una serie de tubos a temperatura ambiente y la otra a 68°C.

Lectura e interpretación:

La formación de burbujas en la superficie se considera como resultado positivo. Si no hay burbujeo, dejar en observación 20 minutos antes de informar un resultado negativo.

SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS POR EL SISTEMA BACTEC 460 TB



REFERENCIA BIBLIOGRAFICA: 8.

RESULTADOS.

De las 973 muestras analizadas 390 correspondieron a esputo, que representa un 40%, 495 fueron orinas con un 51%, 47 muestras de heces con 5%, 8 muestras de líquido pleural tienen un 0.8%, 6 de LCR con un 0.6%, 6 muestras de esmegma con un 0.6%, 5 muestras de líquido seminal con 0.5%, con igual porcentaje 5 muestras de líquido ascítico, 4 de jugo gástrico con 0.4%, una muestra de líquido sinovial, líquido bronquial, líquido peritoneal, raspado ótico derecho, raspado ótico izquierdo, raspado corneal derecho, raspado corneal izquierdo, equivalente al 0.1% para cada una (Ver gráfica 1).

Así de éstas 973 muestras 903 fueron negativas a la técnica de B.A.A.R. directa (sin decontaminación de las muestras), que corresponde al 92.8%, 70 positivas a dicha técnica representando un 7.2%, lo cual se puede observar en la figura 1.

Las baciloscopías positivas se reportaron con una a tres cruces obteniéndose de diferente número en la serie de muestras, como se ve en el cuadro 1.

De las 70 muestras con resultado positivo al B.A.A.R. sólo se practicó cultivo a 18, de las cuales 10 fueron de esputo y 8 de orina, obteniéndose crecimiento en 9(50%) de esputo, con total negatividad en las de orina (Ver figura 2); las características coloniales, producción de pigmento, tiempo de crecimiento y reporte se observan en el cuadro 2.

El tiempo promedio de crecimiento para la mayoría de las cepas fué de 23 días. observándose un máximo de 30 días sólo para una muestra y un mínimo de 21 días para otra (Ver gráfica 2).

A los cultivos reportados como positivos se les practicó las pruebas de identificación bioquímicas como son niacina, reducción de nitratos y catalasa, confirmando con ellas que se trataba de *M. tuberculosis* en todas las cepas aisladas. Los resultados se observan en el cuadro 3.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad a drogas antituberculosas realizadas a los cultivos positivos indican que el 71% de las cepas fueron resistentes a isoniacida y rifampicina, 28% de ellas eran resistentes a pirazinamida, 14% resistentes a estreptomycinina, etambutol y protionamida; el 100% de las cepas fueron sensibles a tiacetazona. Dos muestras no tuvieron crecimiento de colonias suficiente para ser realizada la prueba en el sistema (Ver el cuadro 4).

Gráfica 1. Porcentaje de Muestras Utilizadas para las Pruebas de B.A.A.R. de Pacientes del Hospital Regional de Zona Nº 25 del I.M.S.S.

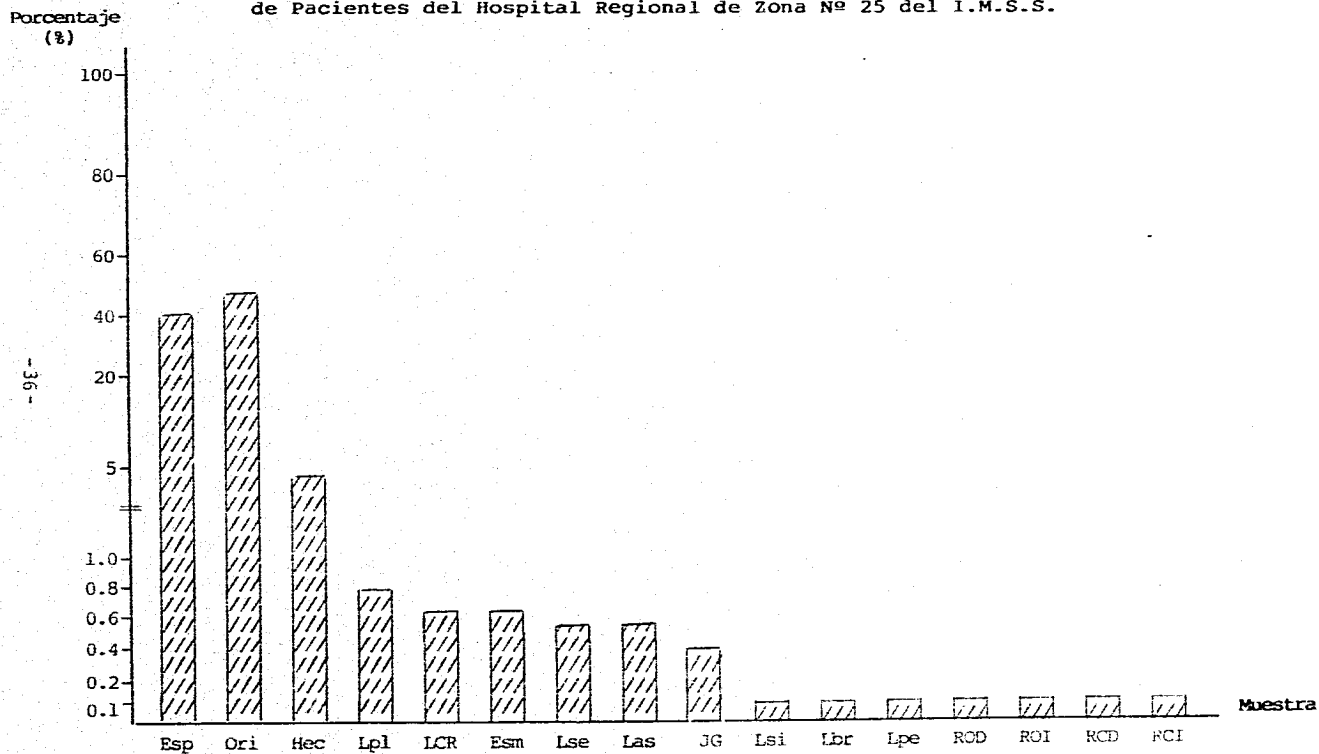
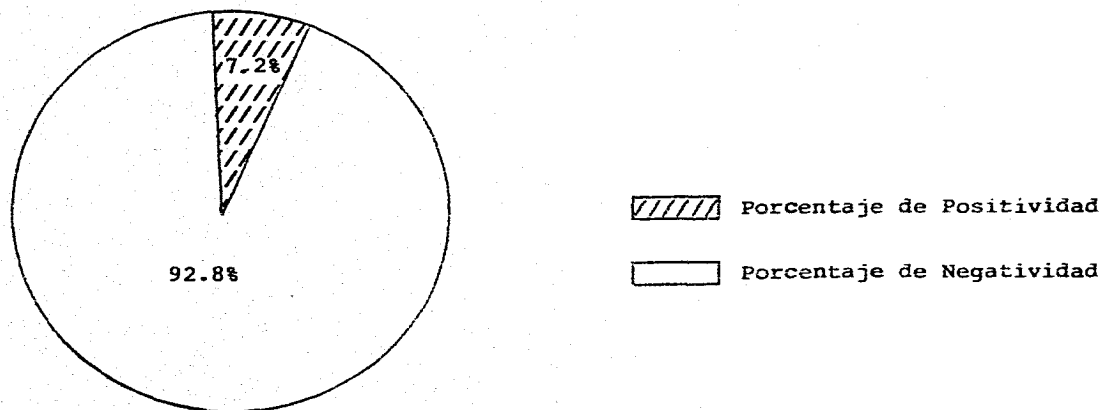


Fig. 1 Porcentaje de Positividad y Negatividad a la Técnica de B.A.A.R. en 973 Muestras Diversas de Pacientes del Hospital Regional de Zona Nº 25 del I.M.S.S.



Cuadro 1. Frotis B.A.A.R. Positivos por el Método de Ziehl-Neelsen en Diferente Número de la Serie de Pacientes del Hospital Regional de Zona Nº 25 del I.M.S.S.

Nº	Folio	Tipo de Muestra	Nº de la Muestra en la serie	Resultado B.A.A.R.	Observaciones
100	SHJ	Orina	7ª, 8ª, 9ª, 10ª	Positivo ++	PMN +++
74	ECJ	Heces	3ª	Positivo +	Lev. +
84	GJM	Orina	3ª	Positivo ++	
128	SRM	Orina	1ª, 2ª	Positivo +	
84	GJM	Esmegma	1ª	Positivo +	
27	VGE	Espuito	2ª, 3ª	Positivo ++	PMN ++
511	IC	Espuito	1ª	Positivo ++	PMN ++
408	LPS	Espuito	1ª	Positivo ++	
129	SRM	Esmegma	1ª	Positivo +	
99	SYF	Espuito	1ª	Positivo +	
109	SBP	Espuito	3ª	Positivo ++	
72	SRS	Espuito	1ª, 2ª, 3ª	Positivo ++	PMN ++
25	NGL	Espuito	1ª, 2ª, 3ª	Positivo ++	PMN ++
122	SRS	Espuito	1ª, 2ª, 3ª	Positivo +++	PMN +, Lev. +
349	LAA	Espuito	1ª,	Positivo +++	PMN +
175	CEA	Orina	5ª	Positivo +	
179	ZME	Orina	5ª, 6ª, 7ª		

Continuación del Cuadro 1. Frotis B.A.A.R. Positivos por el Método de Ziehl- Neelsen en Diferente Número de la Serie de Muestras de Pacientes del Hospital Regional de Zona Nº 25 del I.M.S.S.

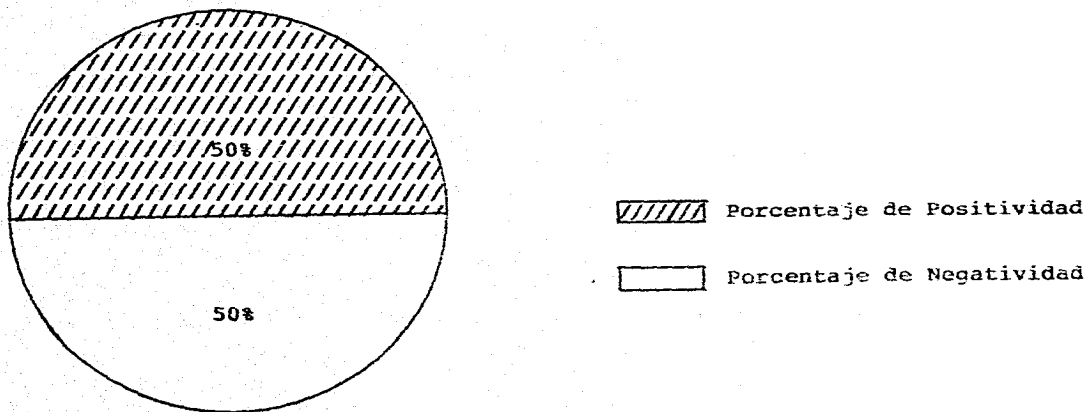
Nº	Folio	Tipo de Muestra	Nº de Muestra en la serie	Resultado B.A.A.R.	Observaciones
77	IPF	Espuito	1ª, 2ª, 3ª	Positivo +	PMN +
338	JFA	Espuito	1ª, 2ª	Positivo ++	PMN ++
93	VPS	Espuito	1ª, 2ª, 3ª	Positivo +++	PMN +++
03	THV	Orina	3ª, 5ª	Positivo +	PMN +
509	MHA	Espuito	1ª	Positivo +	PMN +, Lev. ++
111	MME	Orina	9ª	Positivo +	PMN +++
110	SRS	Espuito	1ª, 2ª, 3ª	Positivo ++	PMN +++
175	CEA	Orina	1ª, 2ª	Positivo +	PMN +
507	ALJ	Espuito	1ª	Positivo ++	PMN +++
111	MME	Esmegma	1ª	Positivo ++	
156	LBE	Orina	1ª, 2ª, 5ª	Positivo +	PMN +++
139	MRC	Espuito	1ª, 2ª, 3ª	Positivo +	PMN +, Lev. +
45	BJC	Orina	2ª, 4ª	Positivo +++	PMN +++
344	MRC	Espuito	1ª, 2ª	Positivo +	PMN ++
08	PVE	Orina	3ª, 5ª-7ª, 9ª	Positivo +	PMN +
66	FPD	Espuito	2ª, 3ª	Positivo ++	PMN ++
11	VSE	Espuito	1ª, 2ª	Positivo +	
08	PVE	Esmegma	1ª	Positivo +	

Cuadro 2. Reporte y Características de Cultivos en Muestras Positivas a la Técnica de B.A.A.R. de pacientes del Hospital Regional de Zona Nº 25 del I.M.S.S.

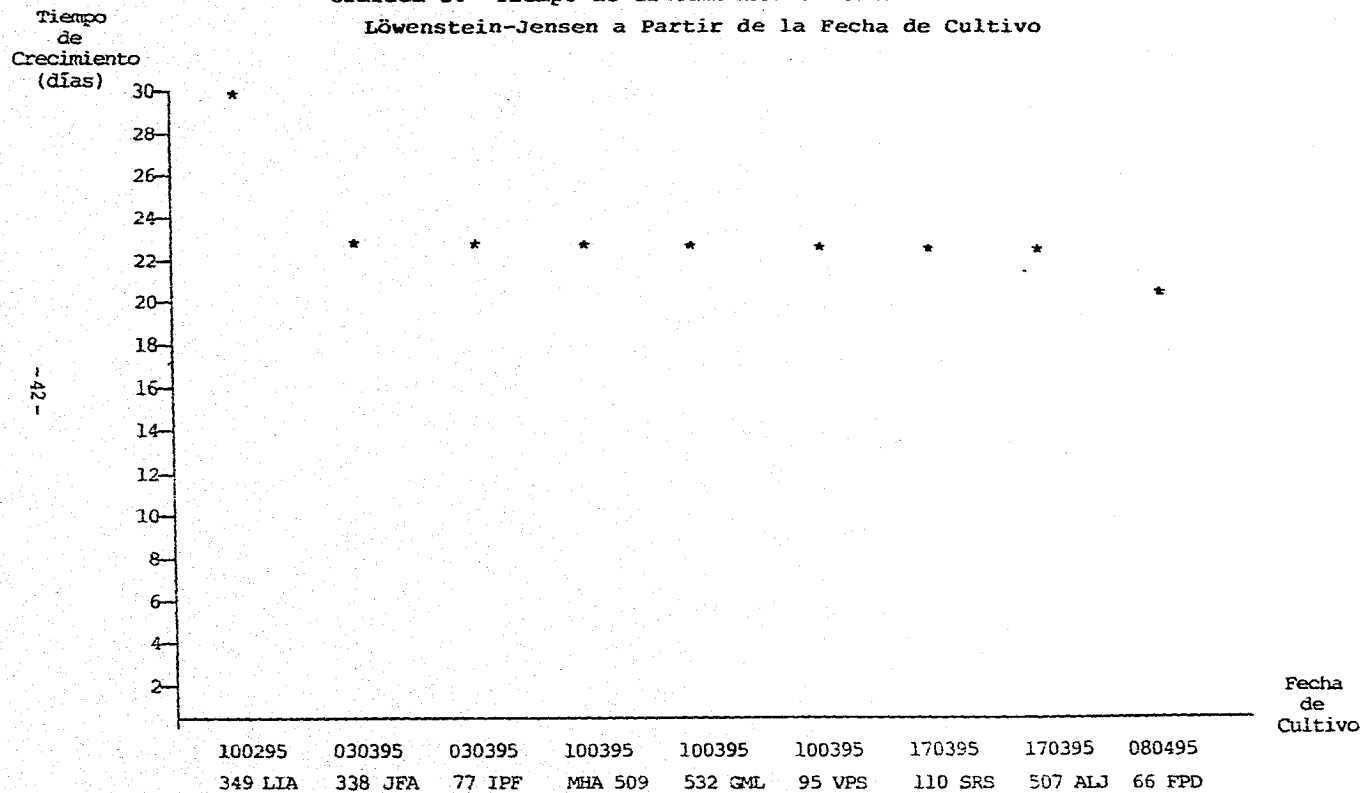
Características del Cultivo						
Nº	Folio	Desarrollo a 37°C	Colonias	Pigmento	Crecimiento	Rep del cultivo
03	THV	-	-	-	-	-
08	PVE	-	-	-	-	-
11	VGE	-	-	-	-	-
25	NGL	-	-	-	-	-
45	BGC	-	-	-	-	-
66	FPD	+	Rugosas	NP	Lento	+++
72	SRS	-	-	-	-	-
77	IPF	+	Rugosas	NP	Lento	+++
93	VPS	+	Rugosas	NP	Lento	+++
110	SRS	+	Rugosas	NP	Lento	+++
111	MME	-	-	-	-	-
175	CEA	-	-	-	-	-
179	ZME	-	-	-	-	-
338	JFA	+	Rugosas	NP	Lento	+++
349	LAA	+	Rugosas	NP	Lento	+++
507	ALJ	+	Rugosas	NP	Lento	+++
509	MHA	3 colonias	Rugosas	NP	Lento	+++

Nota: - = Negativo; + = Positivo; NP = No Pigmentación; R+ = Nº de cruces.

Fig. 2 Porcentaje de Positividad y Negatividad al Cultivo de Muestras Positivas a la Técnica de B.A.A.R.



Gráfica 2. Tiempo de Crecimiento de Colonias en Medio Löwenstein-Jensen a Partir de la Fecha de Cultivo



Cuadro 3. Pruebas de Tipificación a Cultivos Positivos en Muestras de Pacientes del Hospital Regional de Zona Nº 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social

Nº	Folio	PRUEBAS DE TIPIFICACION			Resultado
		Niacina	Red. de Nitratos	Catalasa 68°C	
66	FPD	+	3+	-	M. tuberculosis
77	IPF	+	3+	-	M. tuberculosis
93	VPS	+	3+	-	M. tuberculosis
110	SRS	+	5+	-	M. tuberculosis
338	JFA	+	2+	-	M. tuberculosis
349	LAA	+	5+	-	M. tuberculosis
507	ALJ	+	3+	-	M. tuberculosis
509	MHA	+	5+	-	M. tuberculosis
532	GML	+	5+	-	M. tuberculosis

Nota: + = Positivo; - = Negativo; R+ = Nº de cruces.

Cuadro 4. Pruebas de Sensibilidad a Drogas Antituberculosas en Cultivos Positivos de Pacientes del Hospital Regional de Zona Nº 25 del I.M.S.S

Nº	Folio	DROGAS ANTITUBERCULOSAS						
		Isoniacida	Estreptomicina	Rifampicina	Etambutol	Pirazinamida	Protionamida	Tiazetazona
66	FPD	S	S	S	S	S	S	S
77	IPF	R	S	R	S	S	S	S
93	VPS	R	R	R	S	S	S	S
110*	SRS	-	-	-	-	-	-	-
338	JFA	R	S	R	S	R	S	S
349	LAA	S	S	S	S	S	S	S
507	ALJ	R	S	R	R	S	S	S
509*	MHA	-	-	-	-	-	-	-
532	GML	R	S	R	S	S	S	S

Nota: * = Crecimiento escaso para realizar la prueba.

DISCUSION.

El laboratorio tiene un papel trascendente en el diagnóstico de la tuberculosis. Con la resurgencia de ésta enfermedad, particularmente con la aparición de cepas Multi-Resistentes a Drogas antituberculosas y la infección con HIV recobra interés. Contar con métodos de laboratorio rápidos para la detección e identificación de B.A.A.R. sería importante, más aún cuando los procedimientos de pruebas micobacteriales y pruebas de susceptibilidad a drogas han sufrido cambios radicales en los últimos años, sin embargo, pocos laboratorios cuentan con éstas nuevas metodologías.

Después de las manifestaciones clínicas que presenta el paciente, los hallazgos radiológicos y la prueba tuberculínica, la detección de B.A.A.R. en frotis teñidos en muestras primarias es frecuentemente la primera evidencia de infección. El paso inicial en el diagnóstico de tuberculosis por el laboratorio, es el exámen microscópico de muestras teñidas para la detección de B.A.A.R., sí bien, la sensibilidad del microscopio es relativamente baja, es una herramienta para detectar pacientes infectados que tal vez, puedan requerir aislamiento hospitalario.

De las 973 muestras diversas, que se examinaron por microscopía directa de frotis teñidos por el método de Ziehl-Neelsen, para poder dar un diagnóstico presuntivo de tuberculosis, se logró identificar un porcentaje del 7.2% de baciloscopías positivas, éstos resultados se confirman con los reportados por otras bibliografías que han estudiado la detección de casos por éste método.

Levy et al. (1989) analizaron 2,560 muestras de esputo, obteniendo el 10% de positividad para B.A.A.R. (60). Tales resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo en derechoambientales del I.M.S.S.

Toman K. en 1990 reporta un estudio en pacientes ambulatorios con síntomas pulmonares persistentes, en el Instituto Nacional de la Tuberculosis, en Bangalur, India se trabajaron 2,229 muestras de esputo, obteniendo un porcentaje del 10.2% de positividad a B.A.A.R. (59).

Se puede decir que la detección de B.A.A.R. por microscopía empleando el método de tinción de Ziehl-Neelsen, es una técnica muy útil, rápida y fácil de llevar a cabo en el laboratorio. Sin embargo, no deja de ser presuntiva. Sí el exámen para la búsqueda de B.A.A.R. es realizado adecuadamente, éste representaría en la practica a un exámen de cultivo siempre y cuando la densidad bacilar de la muestra sea alta. Ya Mitchinson D.D. hacía referencia de ello (59).

El diagnóstico definitivo de la tuberculosis es confirmado con el aislamiento del microorganismo a partir de muestras clínicas. Con el cultivo de 18 muestras positivas a la tinción de B.A.A.R. obtuvimos un 50% de positividad, en donde las 9 pertenecieron a muestras de esputo, 8 de orina y una de esputo (50%) con resultado negativo, éste resultado fué probable a la baja concentración de microorganismos en la muestra.

Anargyros P. en 1990 en un estudio realizado en la División Clinical Microbiology, Institute of Medical an Veterinary Sience, Adelaide, South Australia, Reporta que en un período de 5 meses se trabajaron muestras diversas y 46 muestras de B.A.A.R. positivas, se obtuvo un 91% de positividad en el aislamiento de M. tuberculosis (50).

El resultado negativo del cultivo de muestras positivas a l B.A.A.R. puede deberse a varias causas: Primeramente por la escasa densidad bacilar existente en la muestra, principalmente en muestras de orina, el tiempo que transcurre desde la toma de la muestra hasta la elaboración del cultivo, presencia de bacilos saprófitos ácido resistentes o porque los bacilos observados habían perdido su capacidad de proliferar en el cultivo, ésto último puede ser a que en pacientes que han recibido quimioterapia los bacilos pueden haber resultado muertos o dañados gravemente.

El cultivo es un método de diagnóstico confirmativo por su alta sensibilidad, pese a que los resultados éstan disponibles en algunas semanas o meses.

La identificación de las colonias que han crecido en un medio de cultivo es importante, debido a que aparte de *M. tuberculosis* existen otras especies atípicas, algunas de las cuales pueden ser patógenas para el hombre.

La morfología, el tipo, la temperatura de crecimiento y formación de pigmento de las colonias en cultivos positivos son importantes en la identificación de micobacterias. Sin embargo, éstas características son insuficientes para determinar la especie, dado que algunas micobacterias no tuberculosas tienen una morfología similar a la del bacilo tuberculoso cuya principal característica es su ácido resistencia, pero difieren básicamente en su producción de catalasa. Las pruebas bioquímicas (niacina, catalasa y reducción de nitratos) efectuadas a los cultivos dieron una identificación positiva a *M. tuberculosis*.

Las pruebas de sensibilidad realizadas a las 9 cepas obtenidas por cultivo, indican que un 71% de las cepas aisladas de *M. tuberculosis*, fueron resistentes a isoniacida y rifampicina, el 28% resistentes a pirazinamida, el 14% a estreptomocina, etambutol y protionamida, el 100% de ellas son sensibles a tiacetazona. Tenover et al., así como Sepkowitz, hacen mención que en cepas aisladas de pacientes de la ciudad de New York existe resistencia a isoniacida y rifampicina (34,38).

El realizar las pruebas de tipificación y sensibilidad a drogas antituberculosas es importante, no obstante, hacen que la técnica se aún más tardada, además de que se requieren condiciones de trabajo adecuadas por la peligrosidad del microorganismo.

CONCLUSIONES.

La detección de micobacterias por microscopía aplicando la tinción de B.A.A.R. (método de Ziehl-Neelsen) es una técnica sencilla y rápida que permite realizar el diagnóstico presuntivo de la tuberculosis.

El cultivo es un método de diagnóstico confirmativo en muestras clínicas donde la densidad bacilar es alta, pero requiere de algunas semanas para su reporte, además del acondicionamiento de las áreas de trabajo para mayor seguridad del personal.

La especie micobacteriana aislada a partir de muestras pulmonares fué *M. tuberculosis*. Las pruebas de catalasa, niacina y reducción de nitratos son suficientes y concluyentes de la especie aislada con crecimiento normal.

Las pruebas de sensibilidad a drogas antituberculosas indicaron que la isoniacida y rifampicina son las drogas a las que hay más resistencia.

APENDICE.

PREPARACION DE SOLUCIONES.

A. Tinción de Ziehl-Neelsen:

a) Fucsina fenicada.

fucsina básica	3 g.
Alcohol etílico	100 ml.
Fenol acuoso	55 ml.
Agua destilada	c.b.p. 1000 ml.

Fenol acuoso:

Fenol en cristales	100 g.
Agua destilada	10 ml.

b) Azul de metileno.

Azul de metileno	1 g.
Alcohol etílico	100 ml.
Agua destilada	c.b.p. 1000 ml.

c) Solución decolorante.

Acido clorhídrico	1 g.
Alcohol etílico de 95°	970 ml.

B. Decontaminación.

a) Hidróxido de sodio con rojo de fenol al 4%.

Hidróxido de sodio	40 g.
Rojo de fenol	0.04 g.
Agua destilada	c.b.p. 1000 ml.

b) Acido clorhídrico 1 N.

Acido clorhídrico	36.5 ml.
Agua destilada	c.b.p. 1000 ml.

c) Pruebas de tipificación.

Prueba de Catalasa.

a) Solución amortiguadora de fosfatos M/15 pH:7.

Solución A. Fosfato disódico M/15 disolver:

$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	9.47 g.
Agua destilada	1000 ml.

Solución B. Fosfato monopotásico M/15.

KH_2PO_4	9.07 g.
Agua destilada	1000 ml.

Mezclar 61.1 ml. de la solución A con 38.9 ml. de la solución B (ajustar pH).

b) Peróxido de hidrógeno al 30%.

c) Solución acuosa de Tween 80 al 10%. Calentar ligeramente el agua para obtener disolución. Conservar en refrigeración.

Prueba de Niacina.

- a) Bromuro de cianógeno solución acuosa al 10%.
- b) Anilina solución alcohólica al 4%.

Prueba de Nitratos.

- a) Nitrato de sodio M/100 en buffer de fosfato M/15 pH:7

NaNO_3	0.085 g.
KH_2HPO_4	0.117 g.
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.485 g.
Agua destilada	1000 ml.

BIBLIOGRAFIA.

1. Tynes L.L. Tuberculosis: The Continuing Story. JA.M.A. 1993; 270, (21): 2616-7.
2. Bass J.B. Tuberculosis. Clín. Med. de Nort. 1993; 6. 1277-316.
3. Dramond J.M. The arrow of disease. Discover. 1992; 13: 64.
4. Goldsmith M.F. News Reports Make Recomendations, Ask for Resources to Stem TB Epidemic. J.A.M.A. 1993; 276: 187-91.
5. Grange M.J. Enfermedades Micobacterianas. 1ª Edc. Edt. Científica. Méx., D.F. 1990. pp: 11-106.
6. Woods L.G., Washinton II A.J. Micobacteria Other Than Mycobacterium tuberculosis: Review of Microbiologic and Clinical Aspects. Reviews of Infectious Diseases. 1993; 167,(2): 1481-97.
7. Sabater J.F.G., Zaragoza J.M. A simple Identification System for Slowly Growing Micobacteria. II. Identification of 25 Strains Isolated from Surface Water in Valencia (Spain). Acta Microb. Hung. 1993; 40, (4): 343-49.
8. Casal R.M. Microbiología Clínica de las Enfermedades por Micobacterias. Edt. Universidad de Córdoba. España. 1991.
9. Colditz G.A, Frewer T.F. Efficacy of BCG Vaccine in the Prevention of tuberculosis. J.A.M.A. 1994; 271, (9): 698-702.
10. Bass J.F., Farer L.S. Tratament of Tuberculosis and Tuberculosis in Adults and Chlidren. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1994; 149 (6): 1359-74.

11. Manjarrez M.E, Montes S.V. Principales causas de abandono del tratamiento contra al tuberculosis pulmonar. Gaceta Medica de México. 1993; 129 (1): 57-62.
12. Boletín SIDA/ETS. Junio 1993. 13 (3): 11.
13. Orme M.A., Andersen P. T Cell Response to *Mycobacterium tuberculosis*. The Journal of Infectious Diseases. 1993; 167 (2): 1481-97.
14. Zwadyk P.Jr., Down A.J. Rendering of *Mycobacteria* Safe for Molecular Diagnostic Studies and Development of lysis Method for Strand Displacement Amplification and PCR. J. of Clin. Microb. 1994; 32, ((): 2140-46.
15. Altamirano M., Marostenmarki J. Mutations in the Catalasa - Peroxidase Gene from Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. The Journal of Infectious Diseases. 1994; 196: 1162-65.
16. De Cock M.K. et al. Tuberculosis and Infection in Suba-Saharan Africa. J.A.M.A. 1992; 268 (12): 1581-85.
17. Stoecke Y.M. Infectious Diseases. J.A.M.A. 1992; 268 (3): 336-7.
18. Linton J.C., Jalal H. Rapid Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* Strain by Random Amplified Polimorphic DNA Analysis. J. of Clin. Microb. 1994; 32 (9): 2169-74.
19. Reviglione C.M. Snider E.D. Jr., Kochi A. Global Epidemiology of Tuberculosis. J.A.M.A. 1995; 273 (3): 220-25.

20. Tuberculosis Programme, World Health Organization. Tuberculosis Notification Update: December 1993. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1994. Publication HWM/TB/94.175.
21. Blancarte M.L. Manual de Técnicas y Procedimientos de Laboratorio en Tuberculosis 1ª Edc. Edt. I.N.D.R.E. Méx., D.F. 1992.
22. Boletín Mensual de Epidemiología. Méx., Julio. 1993.
23. Tratamiento de la tuberculosis. Guía para el Médico en General. S.S.A. 1990.
24. Selwyn A.P. Skell M.B. Alto Riesgo de Tuberculosis Activa en Consumidores de Drogas Inyectados por el VIH y con Anergía Cutánea. J.A.M.A. (ed. mex.). 1993; 1 (5): 251-57.
25. Udou T. Extracellular Hemolytic Activity in Rapidly Growing Mycobacteria. Can. Journal Microbiology. 1994; 40: 318-21.
26. Jones B.E., Taikewl E.K. Tuberculosis in Patients with HIV infection who Receive Corticosteroids for Presumed *Pneumocystis carinii*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1994; 105 (5): 1338-41.
27. Relkin F. y Cols. Pleural Tuberculosis and HIV Infection. Chest. 1994; 105, (5): 1338-41.
28. Alland D. et al. Transmission of Tuberculosis in New York City. An Analysis by DNA Fingerprinting and Conventional Epidemiologic Methods. The New England Journal of Medicine. 1994; 330 (24): 1710-16.

29. O' Brien R.J. Drug-resistant tuberculosis: etiology, management y prevention. Sem Resp. Infect. 1994; 9 (2): 104-12.
30. Cole T.S. Mycobacterium tuberculosis: drug-resistance mechanism. Trends in Microbiology. 1994; 2 (10): 411-15.
31. Bottger C.E. Resistance to drugs targetin protein syntesis in micobacteria. 1994; 2 (10): 416-21.
32. Huebner R.E., Scein M.F. Delayed type Hipersensitivity Anergy in Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons Screened for infection with Mycobacterium tuberculosis. Clin. Infec. Dis. 1994; 19 (1): 26-32.
33. Pesanti E.L. The Negative Tuberculin Test. Tuberculin, HIV, and Anergy Panels. American Journal of Respiratory and Critical care Medicine. 1994; 149 (6): 1699- 1709.
34. Sepkowitz K.A., Telzak E.E. Trends in Susceptibility of tuberculosis in New York City; 1987-1991. Clinical infectious Diseases. 1994; 18 (5): 755-759.
35. Mabilat C., Desvarenne S. Routine Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates by automated Hibridization. Journal of Clinical Microbiology. 1994; 32 (11): 2702-705.
36. From the C.D.C. Transmission of Multidrug-Resistant Tuberculosis Among Immunocompromised Persons, Correctional System-New York. 1991. J.A.M.A. 1992; 268 (7): 885-86.

37. Huebner F.E., Good C.R., Torats I.J. Current Practices in Microbacteriology; Results of Survey of State Public Health laboratories. Journal of Clinical Microbiology. 1993; 31 (4): 771-775.
38. Tenover C.F. Crawford T.J. The Resurgence of Tuberculosis: Is Your Laboratory Ready?. Journal of Clinical Microbiology. 1993; 31 (4): 767-70.
39. Wiker G.H., et al. A Localization Index for Distinction between Extracellular and Intracellular Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. J. of Gen. Microb. 1991; 137: 875-84.
40. McDonoug A.K. et al. Pathogenesis of Tuberculosis: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with Macrophages. Infection and Immunity. 1993; 61 (7): 2763-73.
41. Riley W.L. Determinants of cell entry and intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis*. Trends in Microbiology. - 1995; 3 (1): 27-30.
42. Bermudez E.L., Kaplan G. Recombinant cytokines for controlling micobacterial infections. Trends in Microbiology. 1995; 3 (1): 22-26.
43. Tópicos Actuales en Tuberculosis. 1993. Sistemas Nacionales de la Salud.
44. Sagué B.C., Dooley W.S. Hospital Outbreak of Multidrug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Infections. J.A.M.A. 1992; 268 (10): 1280-86.

45. Horsburgh R. et al. Predictors of Survival in Patients with AIDS and Disseminated Mycobacterium avium Complex disease. The Journal of Infectious Diseases. 1994; 170: 573-77.
46. Chin P.D. Reingold L.A., Stone N.E. The impact of Mycobacterium avium Complex Bacteria and its treatment on survival of AIDS Patients-A protective Study. The journal of Infectious Diseases. 1994; 170:578-84.
47. Wilson M.S. et al. Progress toward a Simplified Polymerase Chain Reaction and its Application to Diagnosis of Tuberculosis. J. of Clin. Microb. 1993; 31 (4): 776-782.
48. Kennedy N. et al. Polymerase Chain Reaction for Assessing Treatment Response in Patients with Pulmonary Tuberculosis. - The Journal of Infectious Diseases. 1994; 170: 713-16.
49. Raoult D. Letters to the Editor Predictive Value of PCR Applied to Clinical Samples for Mycobacterium tuberculosis Detection. J. of Clin. Microb. 1990; 28 (6): 1288-91.
50. Anargyros P. et al. Comparison of Improved BACTEC and Löwenstein-Jensen Media for Culture of Mycobacteria from Clinical Specimens. J. of Clin. Microb. 1990; 28 (6): 1288-91.
51. Yagoupsjy V.P., Kaminiski A.D. Cord Formation in BACTEC 7H 12 Medium for Rapid, Presumptive Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex. J. of Clin. Microb. 1990; 28 (6): 1451-3.
52. McCarter S.Y., Robinson A. Detection of Acid-Fast Bacilli in Concentrated Primary Specimen Smears Stained with Rhodamine-Auramine at Room Temperature and a 37°C. J. of Clin. Microb. 1994; 32 (10): 2487-89.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

53. Githi W., Kitui F. A comparative study on the reliability on the fluorescence microscopy and Ziehl-Neelsen method in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. East. Afr. Med. J. 1993; 70 (5): 263-66.
54. Levee G., Glaziou P. Follo-up of tuberculosis patients undergoing standard anti-tuberculosis chemoterapy by using a polymerase chain reaction. Res. Microb. 1994; 145 (1): 5-8.
55. Baket J.F. Medical Microbiological Techniques. 1ª Edc. Edt. Acribia. Zaragoza, España. 1990. pp: 253-63.
56. Ellner J., Hinman R.A. Tuberculosis Symposium: Emerging Problems and Promise. The Journal of Infectious Diseases. 1993; 168: 537-51.
57. Baxter R. Large-Scale use of PCR for Detection of Mycobacterium tuberculosis in a Rutine Mycobacteriology Laboratory. J. of Clin. Microb. 1994; 32 (1):273-75.
58. Piersimoni C. et al. Comparative evaluation of the MB-Chek - System for recovery of micobacteria clinical specimens. Infect. Dis. 1992; 11 (2): 1174-77.
59. Tomas K. tuberculosis. Detección de casos y quimioterapia. Preguntas y Respuestas. Organización Panamericana de la Salud - (Publ. Cient. 392) 1980.
60. Levy H. et al. A Reevaluation of Sputum Microscopy and Culture in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. Chest. 1989; 95: 1193-97.

61. Jawetz E. Microbiología Médica. Edt. Manual Moderno. Méx., D.F. 1983. pp: 221-28.
62. Murray P. Microbiología Medica. 1ª Edc. Edt Times Mirror. España. 1992. pp: 210-30.
63. Lennette H.E. Manual de Microbiología Clínica. 4ª Edc. Edt. - Medica Panamericana. Buenos Aires , Argentina. Cap: 22.
64. Zinzzler A. Microbiología. 18ª Edc. Edt. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1992. Cap:33.
65. Konneman E. Diagnóstico Microbiológico. 3ª Edc. Edt. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1994. Cap:13.
66. Kumate G.G. Manual de infectología. 11ª Edc. Edt. Fco. Méndez Hdez. Méx., D.F. 1990. pp:129-47.
67. Mejía R. Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para la Bacteriología de la tuberculosis. Organización Panamericana de la Salud (Nota Tec. Nº 26). 1984.
68. Sidney M.F. Diagnóstico Microbilógico. 7ª Edc. Edt. Medica Panamericana. Buenos Aires Argentina. 1993. Cap:41.
69. Sabié B. et al. Evaluation of Polimerase Chain Reaction, Tuberculostearic Acid Analysis, and Direct Microscopy for The Detection of Mycobacterium tuberculosis in Sputum. The Journal of Infectious Diseases. 1992; 166; 1177-80.