

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Propuesta para estandarizar la metodología en la investigación por baciloscopía de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de esputo.

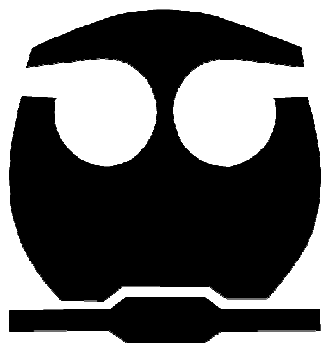
Trabajo Escrito vía cursos de educación continua.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Q U Í M I C A

P R E S E N T A :

TANIA BETHZABÉ CUEVAS MEJÍA



México, D.F.

2007.



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	María del Socorro Alpizar Ramos
Vocal	Rosalinda Velázquez Salgado
Secretario	José Rubén Dávila Solares
1er. Suplente	José Sabino Samano Castillo
2º. Suplente	Ma. De los Ángeles Granados Silvestre

Asesor del tema: QFB. José Rubén Dávila Solares

Sustentante: Tania Bethzabé Cuevas Mejía

AGRADECIMIENTOS

QFB. JOSÉ RUBÉN DAVILA SOLARES por tu entusiasmo colaboración y asesoría al presente trabajo.

M en C. MARÍA DEL SOCORRO ALPIZAR RAMOS por las aportaciones que dio al presente trabajo.

QFB. ROSALINDA VELÁZQUEZ SALGADO por su comprensión y sobre todo la colaboración al presente trabajo.

M en C. MARÍA ASUNCIÓN CASTELLANOS ROMÁN. Por el apoyo que siempre he recibido de usted desde el día en que me presente en su laboratorio por ser una de las mujeres ejemplares que he conocido y por toda su amistad.

SECRETARÍA DE EXTENSIÓN ACADÉMICA.

Programa de educación continua.

Ing. Jorge R. Martínez Peniche. Secretario de Extensión Académica.

M en C. ZOILA NIETO VILLALOBOS. Secretaria técnica de Extensión Académica.

IQ. ALEJANDRA C. SORIANO ARROYO.

FACULTAD DE QUÍMICA por toda la formación profesional recibida.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Es un orgullo haber pertenecido a la máxima casa de estudios.

AGRADECIMIENTOS

A MI HIJO OSMAN EMILIANO JIMÉNEZ CUEVAS. *Quien es el motor y alegría de mi vida.*

A MI MADRE *Por ser el ejemplo más grande de mi vida y muestra de perseverancia, tenacidad y fortaleza.*

PAPÁ ALE *Gracias por estar; por que el apoyar comienza con estar.*

PAPÁ *por el apoyo brindado en las situaciones más importantes.*

HERMANOS CARLOS, ZAGIT y SAMARA *siempre estaremos juntos.*

A MIS ABUELAS HERLINDA Y MARÍA EUGENIA *gracias sobre todas las cosas por el amor que recibo de ustedes, mi infancia no sería la misma sin ti GECHEA.*

A MIS TÍAS HERLINDA Y MARTHA *siempre dispuestas a escucharme y aconsejarme.*

SANDRA *por ser parte de mi vida, por tu gran amistad y por todo el cariño recibido durante tantos años.*

CESAR *pocos hombres como tú, gracias por tu amistad.*

LALO, YOYIS, ELSA *La ratos compartidos con ustedes realmente fueron especiales y compartir esa etapa con ustedes fue de los mejor.*

JESÚS y ÁNGEL *siempre dispuestos a brindar alegría y ayuda.*

Mis nuevas amigas y amiguitos

JUANITA y LUPITA *por la ayuda y comprensión.*

CHABELITA y RAULITO *parte del trío maravilla gracias por su amistad y cariño.*

LULÚ, ALEX *por hacer más amena los ratos de trabajo y más haya..*

A MI HIJO,

A MI MADRE.

LAS METAS SE PROPONEN . . .

Y SE ALCANZAN.

ÍNDICE

OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS PARTICULARES	3
PLANTEAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA	4
INTRODUCCIÓN	4
CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO	5
1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO <i>Mycobacterium</i>	5
1.2 MICROORGANISMOS PERTENECIENTES AL GÉNERO <i>Mycobacterium</i>	7
1.3 MORBI-MORTALIDAD DE LA TUBERCULOSIS	11
1.4 TUBERCULOSIS	12
1.5 TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS	13
1.6 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	14
1.7 ESPUTO	15
1.8 MUESTRAS DE ESPUTO PARA EL DIAGNOSTICO	17
1.9 FROTIS	17
CAPÍTULO 2 PROPUESTA DE TÉCNICA PARA BACILOSCOPÍA EN ESPUTO	18
2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRA	18
2.1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA DE ESPUTO	19
2.1.2 CRITERIOS PARA RECHAZO DE MUESTRA	19
2.1.3 MANEJO DE MUESTRA	19

2.2 REGISTRO DE INFORMACIÓN Y DATOS DEL PACIENTE	19
2.3 PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE REACTIVOS, EQUIPO Y MATERIAL	20
2.4 ASEGURAMIENTO DE CALIDAD PARA LA TÉCNICA DE BACILOSCOPIA	21
2.5 MEDIDAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO MICROBIOLÓGICO	22
2.6 TRATAMIENTO DE DIGESTIÓN-DESCONTAMINACIÓN DE MUESTRAS	23
2.7 DIGESTIÓN-DESCONTAMINACIÓN CON N-acetil-cisteína-NaOH al 2%	24
2.8 PREPARACIÓN DEL FROTIS	25
2.8.1 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA-PORTAOBJETOS	25
2.8.2 EXTENSIÓN	25
2.8.3 DESECACIÓN	25
2.8.4 FIJACIÓN	25
2.9 TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN	26
2.10 EXAMEN MICROSCÓPICO DE LAMINILLAS	27
2.11 INFORME DE RESULTADOS DE LA BACILOSCOPIA	29
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFÍA	35

OBJETIVO GENERAL

Implementar y estandarizar la metodología de baciloscopía en muestras de esputo, para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en el laboratorio clínico del Hospital General de Zona No. 26 del Instituto Mexicano del Seguro Social.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Establecer las características de la muestra, así como las especificaciones del recipiente contenedor para la obtención de muestras de esputo correctas.

- Establecer las características y condiciones del equipo, material y reactivos para una óptima operación.

- Proponer el método de digestión-descontaminación-concentración, que permita una mejor recuperación de micobacterias, y que reduzca la contaminación en las muestras.

- Disponer las condiciones necesarias para la adecuada identificación, extensión, desecación y fijación de los frotis de muestras de esputo.

- Establecer parámetros de interpretación del examen microscópico según lineamientos de la Organización Panamericana de la Salud para el Control de la Tuberculosis.

- Proponer y establecer los parámetros de eliminación de interpretaciones equivocadas y deficiencias en el proceso de investigación por esta técnica propuesta.

PLANTEAMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA

Una situación muy peculiar que se presenta en la Institución en la que se propone la Implementación y estandarización de la metódica propuesta, es la constante rotación del personal en el laboratorio clínico, que particularmente genera entre otros problemas, el continuo desarrollo de modificaciones a la técnica de investigación por baciloscopía de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de esputo.

La referencia peculiar y particular se refiere a la modificación que se lleva a cabo entre el personal de cada turno y por cada individuo, lo cual se traduce no solo en un problema de metodología sino incluso, en la forma como es interpretado el examen microscópico, lo cual no solo provoca disminución de la sensibilidad y especificidad en la técnica, sino que los resultados que se obtienen son poco confiables, por lo tanto se propone la implementación y estandarización de una técnica de investigación por baciloscopía en muestras de esputo, lo cual permita la optimización de la metódica.

Ambiciosamente se pretende que al través de esta propuesta se pudiera dejara implementada para su aplicación por todo personal responsable de los diferentes turnos del área de bacteriología del laboratorio Clínico del Hospital General de Zona No. 26.

INTRODUCCIÓN.

Hasta el momento, se han logrado grandes avances en el conocimiento del agente infeccioso *Mycobacterium tuberculosis* que provoca la Tuberculosis, lo cual ha permitido no solamente el tratamiento y control de la transmisión de la enfermedad, sino incluso la prevención mediante la creación de una vacuna, sin embargo continúa siendo un grave problema de gran magnitud en materia de salud a nivel mundial, sobre todo porque en los países en vías de desarrollo se sigue presentando de manera aguda debido a la falta de recursos para la prevención, manejo y control de la misma, entre ellos nuestro País.

Precisamente por la falta de recursos, es por lo que el examen microscópico de las muestras de esputo o la baciloscopía, sea la herramienta ideal que tenga la mejor relación costo-beneficio para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de pacientes con tuberculosis contagiosa. Aunque la baciloscopía sea una técnica simple, barata y apropiada, es relativamente fácil de realizar y sobre todo debe tenerse mucho cuidado en su lectura al microscopio, permite obtener resultados rápidos, y lo que necesitamos es asegurarnos que sean con una técnica de gran sensibilidad para la detección oportuna de posibles sujetos potenciales de transmitir el bacilo tuberculoso.

Siendo la tuberculosis pulmonar la forma clínica más frecuente de los casos totales de tuberculosis (85%), la muestra de esputo se convierte en el principal objeto de estudio para el laboratorio en el área de bacteriología (1). Por ello es de suma importancia contar con una metodología óptima, según los recursos proporcionados por las instituciones de salud.

CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO

1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO *Mycobacterium*.

Las micobacterias pertenecen al género *Mycobacterium*, son bacilos aerobios inmóviles y no esporulados que presentan en ocasiones filamentos ramificados, pero pueden romperse con facilidad. *Mycobacterium tuberculosis* tiene una morfología muy característica, es un bacilo delgado con forma recta o ligeramente curvada en frotis, su tamaño suele ser de 3-5 μ de largo 1-4 μ de ancho (2) (3). La estructura celular de éste consta de una gruesa pared separada de la membrana celular por el espacio periplásmico que está compuesta por cuatro capas, principalmente formada por lípidos, proteínas y sustancias antigénicas:

1. Peptidoglicano, con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glicosilmurámico.
2. Polímeros de arabinosa y galactosa.
3. Ácidos micólicos.
4. Lípidos superficiales (micósidos, cord factor y sulfolípidos).

Lípidos: Responsables de la ácido-alcohol-resistencia. Representan el 40% del peso seco de la bacteria y están localizados principalmente en la pared. Los principales son:

- Ácidos grasos de cadena lineal (ácido palmítico y oleico)
- Ácidos grasos de cadena ramificada (ácidos ftienoico, micocerósico, micólico y tuberculoesteárico)
- Lípidos neutros (triglicéridos y ceras)
- Fosfolípidos (Cardiolipina, fosfatidil-etanolamina fosfatidol-inositol y manofosfoinositósidos).

Proteínas: Responsables de la reacción tuberculínica. Formación de anticuerpos.

Antígenos: Se clasifican en 4 grupos:

- Existentes en todas las especies del género.
- En cepas de crecimiento lento.
- En cepas de crecimiento rápido.
- Específicos de especie (4)

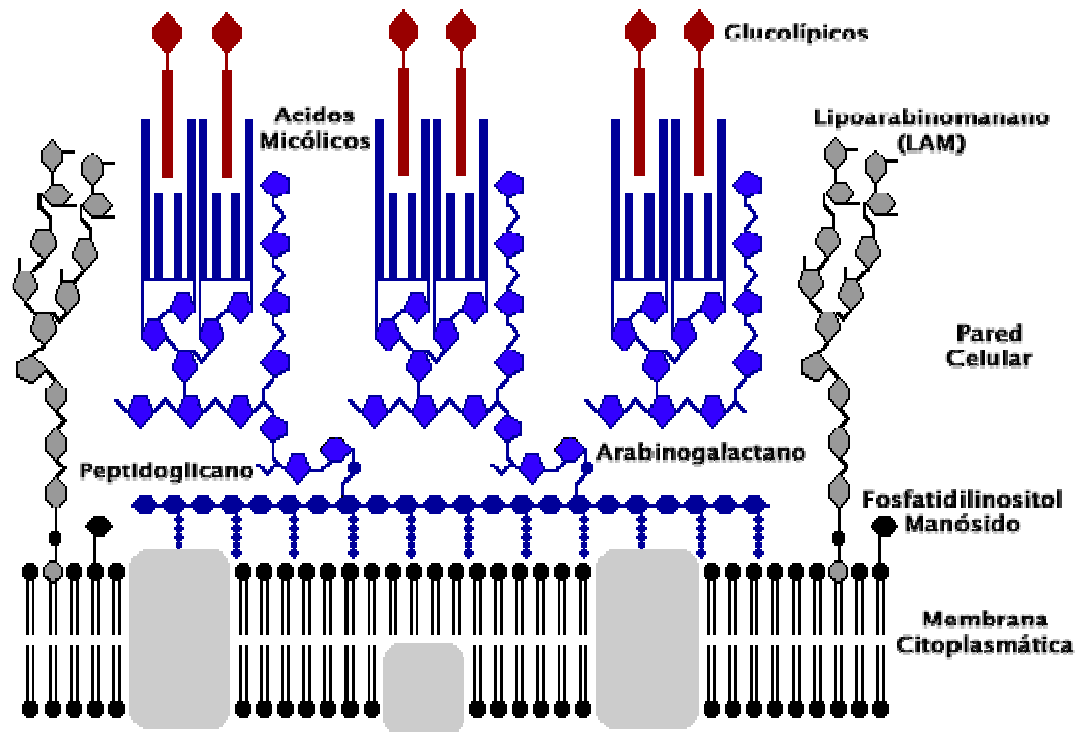


Figura 1. Pared celular micobacteriana.

La presencia de estos ácidos micólicos y de otros lípidos por fuera de la capa de peptidoglucano hace que las micobacterias sean ácido-alcohol-resistentes; es decir: la fucsina básica no puede ser eliminada de la célula por el tratamiento con alcohol ácido.

El *Mycobacterium tuberculosis* es una especie mucho más resistente a los agentes físicos y químicos antibacterianos, que otras bacterias particularmente resistentes a la desecación: se puede mantener viable sin humedad durante varios meses, sin embargo la pasteurización lo inactiva.

El bacilo de *Mycobacterium tuberculosis* no difiere con las otras bacterias en cuanto a su citoplasma y a su ADN nuclear. Su contenido de guanina y citosina (G+C) en el ADN es de 62 a 70 moles por 100. Los bacilos de esta especie tienen un crecimiento requerimientos nutricionales muy exigentes y un tiempo de incubación muy lento, incluso en condiciones óptimas, dividiéndose cada 12-24 horas y requiere de 10 a 20 días de incubación a 37°C con un pH óptimo de 7. (5)(6)

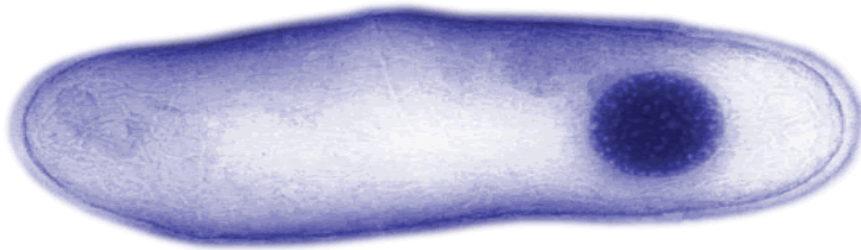


Figura 2. *Mycobacterium tuberculosis*.

1.2 Microorganismos pertenecientes al género *Mycobacterium*.

COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis. *M. bovis* *M. Bovis BCG.* *M. africanun*

MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS

De crecimiento lento No fotocromógenas	Escotocromógenas	De crecimiento rápido Potencial patogenicidad
Complejo <i>M. avium</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. celastum</i>	<i>M. scrofulaceu</i>	<i>M. chelonae</i>
<i>M. genavense</i>	<i>M. interjectum</i>	<i>M. abscessus</i>
<i>M. haemophilum</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. malmoense</i>	<i>M. cookii</i>	<i>M. peregrinum</i>
<i>M. shimoidei</i>	<i>M. hiberniae</i>	<i>M. mucogenicum</i>
<i>M. simiae</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. xenopi</i>	<i>M. conspicuum</i>	<i>M. wolinskyi</i>
Complejo <i>M. térrea</i>	<i>M. heckerhornenese</i>	<i>M. goodii</i>
<i>M. heidelbergense</i>	<i>M. tusciae</i>	<i>M. septicum</i>
<i>M. brander</i>	<i>M. kubicae</i>	<i>M. magerotemse</i>
<i>M. triplex</i>		

Fotocromógeno	No cultivable	Rara vez patógena o aún no asociada con infección
<i>M. kansasii</i>	<i>M. Leprae</i>	<i>M. agri, M. aichiense, M. Ausreoaffricanum, M. aurum,</i>
<i>M. asiaticum</i>		<i>M. chitae, M. chubuense, M. doernhoferi, M. duvalii,</i>
<i>M. marinum</i>		<i>M. fallas, M. flavescens, M. gadium, M. thermoresistible,</i>
<i>M. novocastrense</i>		<i>M. gilvum, M. komossense, M. moriokaense,</i>
		<i>M. murale, M. neoaurum, M. obuense, M. vaccae,</i>
		<i>M. phlei, M. pulveris, M. senegalense, M. tokaiense,</i>
		<i>M. rhodesiae, M. sphagni, M. thermoresistible. (7)</i>

1.3 MORBI-MORTALIDAD DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis, sigue constituyendo un problema de salud pública en el mundo, particularmente en los países en vías de desarrollo. En estos y aún en los países desarrollados la emergencia de la coinfección por VIH/SIDA-tuberculosis ha agravado el panorama para su control efectivo.

La mortalidad mundial por tuberculosis es aproximadamente de 2 millones de personas por año, el sur-este asiático 625 mil, África 556 mil y Latinoamérica 6 mil. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que entre el año 2000 y el 2020, 200 millones de personas enfermarán y 35 millones morirán de tuberculosis si no se hace un riguroso control.

(8)(10)

La OMS informa que a nivel mundial un tercio de la población está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*; cada año se estima aproximadamente 8 millones de casos nuevos y 1.5 millones de defunciones por tuberculosis. (8)(11) En México, en el año 2003, se diagnosticaron alrededor de 17 mil casos nuevos y casi 2,500 defunciones fueron por esta causa. Al igual que en otros países, en México la epidemia de VIH/SIDA, la diabetes, la desnutrición, las adicciones y la resistencia a fármacos antituberculosos, agravan el panorama epidemiológico. (11)

La mortalidad en el año de 1999 ocupó el lugar número 19 con 3.3 muertes por cada 100,000 habitantes, siendo la segunda causa de muerte ocasionada por un sólo agente etiológico (sólo superada por el VIH/SIDA) y el 95% de las defunciones ocurre en mayores de 15 años, población económicamente activa. Los últimos 10 años, el estado con la mortalidad más alta en el país ha sido Chiapas. (9)

1.4 TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa y sistémica, provocada en la mayoría de los casos por un bacilo denominado *Mycobacterium tuberculosis*. La infección se adquiere por la inhalación de partículas infecciosas en forma de aerosoles que se depositan en los alvéolos respiratorios periféricos. En este sitio son fagocitados por macrófagos alveolares, estas células presentan en ocasiones capacidad para destruir los bacilos ingeridos, de no ser así, las micobacterias seguirán multiplicándose hasta que el macrófago estalla de tal forma que produce una diseminación primaria en el pulmón dando paso a lo que se denomina **tuberculosis pulmonar**. Algunos de los macrófagos infectados se transportan por los vasos linfáticos hacia los ganglios linfáticos hiliares que drenan el sitio infectado. Desde allí pueden ser propagados por la sangre y la linfa hacia diversos tejidos, riñón, meninges, hígado, cerebro e incluso huesos, así entonces ocurre la **tuberculosis extra-pulmonar**.

Aspectos clínicos:

La tuberculosis se desarrolla en el organismo humano en dos etapas. La primera etapa ocurre cuando un individuo que está expuesto a bacilos provenientes de un individuo contagioso es infectado denominándose *infección tuberculosa o Tuberculosis primaria*, y la segunda cuando el individuo infectado desarrolla la enfermedad denominada *tuberculosis crónica*.

Tuberculosis primaria.- En esta etapa la tuberculosis manifiesta sólo fiebre y malestar general, las lesiones que se producen por la colonización del bacilo en los pulmones da lugar a una neumonitis y diseminación del agente a los ganglios linfáticos del hilio pulmonar. Cuando el paciente forma una respuesta inmune eficiente en esta etapa, los datos clínicos van remitiendo poco a poco, las lesiones se van reabsorbiendo, pero el bacilo puede permanecer viable durante muchos años en lesiones calcificadas.

Tuberculosis crónica.- Se trata en la mayoría de los casos de una reactivación de los focos primarios que quedaron en los hilios pulmonares, de donde se genera una proliferación del bacilo propiciada por una baja en la respuesta inmune causada por cualquier factor tal como la desnutrición, el tratamiento con corticoesteroides, la infección por virus de la inmunodeficiencia humana u otra causa. (12)(13)

La sintomatología comienza con tos seca en un inicio, y conforme progresa la enfermedad se produce esputo hemoptoico y en algunas ocasiones hemoptisis. Con la enfermedad sostenida progresan síntomas como: fiebre, malestar general, pérdida de peso y fatiga. A la vista radiológica los infiltrados que aparecen formar cavidades de destrucción progresiva del tejido pulmonar. En muy pocos casos se manifiesta tuberculosis por reactivación en otro tipo de órganos, lo cual se manifiesta como un tubérculo y en el caso de meninges, la meningitis crónica mortal. La evolución de una tuberculosis sin tratamiento establece una situación interna devastadora que consume al individuo en un plazo de dos a cinco años. (14)(21)

1.5 TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS.

Debido a la alarmante situación de la tuberculosis en el mundo se han introducido nuevas técnicas dirigidas hacia una recuperación más efectiva de micobacterias en muestras clínicas, así como su rápida identificación y determinación de perfiles de susceptibilidad a las diferentes drogas con que son tratadas.

- **Instrumentos automatizados o semiautomatizados.** El uso de instrumentos ha permitido que el período de recuperación de micobacterias a partir de esputo y otros materiales, incluidos los cultivos de sangre, haya sido acortado a tiempos de 2 o 3 semanas, por ejemplo el BACTEC 460 es uno de ellos, que además de acortar el tiempo se utiliza para la realización de “prueba rápida de susceptibilidad” a los medicamentos antituberculosos de primera elección, la cual consiste en la detección del índice de crecimiento del microorganismo en un frasco con tapa de rosca que contiene el antibiótico, el crecimiento dentro de los 3 a 5 días posteriores a la inoculación, indicará que la cepa es resistente a la droga.

- **Medio de cultivo líquido.** El índice de recuperación y el tiempo de detección de positividad para micobacterias provenientes de muestras clínicas ha mejorado con el empleo de medios de cultivo líquidos. En la actualidad, se dispone de dos sistemas comerciales para uso en laboratorios y que no son sistemas automatizados. Uno de ellos el Septi-Chek AFB System (BBL) y el Mycobacteria Growth Indicator Tube System (MGIT) otro, los cuales utilizan caldo 7H9 y un sensor fluorescente sensible al O₂ como indicador de crecimiento bacteriano. Estas pruebas detectan en su sistema la fluorescencia más rápidamente que otros sistemas líquidos que detectan la turbidez, e incluso que la detección de colonias en el medio Löwentein Jensen o colonias en un agar sintético.

- **Inoculación en medios de cultivo con base de agar.** Este tipo de pruebas utiliza una base de agar transparente, lo que permite la observación microscópica de microcolonias de 5 a 7 días después de la inoculación de muestras positivas de frotis. La morfología de microcolonias se emplea para la identificación temprana presuntiva de *M.tuberculosis* y de *M.avium intracellulare*, técnica de gran ayuda en el proceso de identificación de micobacterias para el ensayo de sondas de ácidos nucleicos.

- **p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona.** El NAP es un agente antimicobacteriano inhibidor selectivo de desarrollo de *M. tuberculosis* en medios de cultivo líquidos. Agente utilizado en el BACTEC, en el frasco con tapa de rosca en el que se inocula el microorganismo que se está investigando, lo cual permite que cualquier desarrollo después de 3 días de la incubación descarte la presencia de *M. tuberculosis*. (3)

1.6 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

- **Cromatografía; gas-líquido, líquida de alta resolución y espectrometría de masa.** La composición de los ácidos micólicos y los constituyentes de los ácidos grasos de la pared celular, determinada por cromatografía, proporciona perfiles útiles para realizar una identificación rápida de especies de micobacterias, recuperadas de muestras clínicas.

- **Sistema lisis-centrifugación en tubos de cultivos con sangre.** La recuperación de micobacterias a partir de muestras de sangre periférica y de médula ósea puede mejorar por liberación de células micobacterianas intracelulares en medio de caldo de cultivo con sangre, aumentando el índice de recuperación y reduciendo los tiempos de recuperación.

- **Sondas de ácido nucleico no isotópicas.** En la actualidad se cuenta comercialmente con sondas para la confirmación del complejo *M. Tuberculosis* entre otras, el desarrollo y avance de nuevas sondas está en función de que se definan mejor los síndromes clínicos relacionados con las otras micobacterias diferentes de *M. tuberculosis*.

- **Reacción de polimerasa en cadena.** Amplificando secuencias blanco específicas de DNA extraído de células micobacterianas en muestras clínicas (como de esputo), puede lograrse

una identificación rápida de la infección por *M. tuberculosis*, aunque teóricamente es posible detectar una secuencia de DNA específica proveniente de una única célula de micobacterias después de la amplificación de la reacción de polimerasa en cadena (PCR), la concentración de corte más baja en las muestras de esputo directas es de 42 unidades formadoras de colonias, lo cual corresponde a ocho que pueden ser recuperadas de cultivos provenientes de materiales procesados con NALC-NaOH.

▪ **Ensayos de restricción de endonucleasas.** Después de la amplificación por PCR de las secuencias conservadas de rRNA o DNA blanco extraído de micobacterias, se han aplicado procedimientos de digestión con endonucleasas de restricción tanto para ayudar a la identificación de especies como para determinar la variación de las cepas para estudios epidemiológicos. (15)

1.7 ESPUTO

Es característica de todo individuo producir secreciones de vías respiratorias, una persona sana no fumadora produce entre 100 y 250mL de mucosidad por día. Normalmente el moco es transportado hacia arriba por el epitelio mucoso ciliado y deglutido, proceso que en condiciones normales pasa desapercibido, sin embargo, la expectoración de esputo siempre resulta ser un proceso anómalo, y constituye un signo de que se ha generado un exceso de moco, ello puede deberse a irritación de las vías respiratorias (generalmente causada por consumo de tabaco o por resfriado común) o bien a un proceso infeccioso. El esputo puede clasificarse según los siguientes tipos:

- Mucoide: claro, gris o blanco.
- Seroso: acuoso o espumoso.
- Mucopurulento: de tono amarillento
- Purulento: verde oscuro-amarillo.

Para el análisis de muestras de esputo siempre se ha de realizar el examen macroscópico de la muestra y tomar nota de sus características así como de su volumen, color, consistencia y olor, registros que proporcionan pistas sobre la patología subyacente. La coloración amarilla-verdosa suele ser signo de infección y es consecuencia de la mieloperoxidasa producida por eosinófilos o neutrófilos, aunque en los casos de asma, el esputo contiene alto número de

eosinófilos que confiere la coloración amarillo o verde, sin que con ello exista alguna infección subyacente. (29)

Las secreciones traqueo-bronquiales son una mezcla de plasma, agua, electrolitos y mucina (moco), a medida que las secreciones atraviesan las vías inferiores y superiores se contaminan con exfoliaciones celulares, secreciones nasales y de las glándulas salivales así como de flora bacteriana normal de la cavidad oral, es a esta mezcla de secreciones y partículas que se le denomina **esputo**. Las glándulas mucosas y el epitelio de superficie constituyen las principales fuentes de las secreciones traqueó-bronquiales. Las propiedades físicas del esputo revelan que las secreciones son viscosas y elásticas, es decir, que poseen las propiedades de los líquidos y de los sólidos. Su consistencia depende principalmente de la estructura molecular de las gluco-proteínas y el grado de hidratación (contenido de agua), pero es el ácido siálico primordialmente el que contribuye a darle la viscosidad al esputo.

La composición química del esputo muestra que un 95% es agua y un 5% son sólidos. Los sólidos principales son carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos y DNA y estos aumentan proporcionalmente con el incremento del proceso inflamatorio. El DNA presente se origina a partir de los restos de leucocitos, macrófagos y células del epitelio bronquial, a pesar de que se inhalan elevadas cantidades de microorganismos viables, las vías respiratorias bajas se mantienen estériles, gracias a dos mecanismos: el sistema macrófago alveolar y el moco ciliar.

1.8 MUESTRAS DE ESPUTO PARA EL DIAGNOSTICO.

Cuando una persona enferma de tuberculosis pulmonar tose existe un gran riesgo de contagio e infección, ya que en la expectoración se encuentran contenidos los bacilos causantes de tuberculosis, por ello en la formación de aerosoles radica su contagiosidad, entonces es en la expectoración en la que se centra el estudio de la baciloscopía.

Las muestras de esputo se pueden clasificar en:

- *Salival*: cuando el mayor porcentaje es saliva.
- *Purulenta*: cuando es amarilla.
- *Mucopurulenta*: cuando hay partículas amarillentas o verdosas visibles en el moco.
- *Sanguinolenta*: cuando hay contenido de sangre.

Las muestras deben ser examinadas en el laboratorio al microscopio, y se define un caso de tuberculosis con baciloscopía positiva, cuando una persona presenta síntomas clínicos respiratorios y tiene por lo menos dos baciloscopías positivas. A este método se le llama **detección pasiva** y detecta alrededor del 80% de los casos sospechosos con el examen de baciloscopía en la primera muestra, a un 15% adicional con la segunda muestra y a un 5% restante con el resultado de una tercera muestra.

Muestras de esputo para el seguimiento. El tratamiento de la tuberculosis comprende dos fases: la fase **intensiva** que dura habitualmente 2 ó 3 meses y la **fase de continuación** que dura entre 4 a 10 meses, por lo que un seguimiento adecuado consiste en realizar conjuntamente con el tratamiento medicamentoso la baciloscopía y llevar integralmente el control del tratamiento y la evolución de la enfermedad. En esta situación es en la que la baciloscopía determinará si el paciente permanecer en la fase intensiva o pasara a la fase de continuación, de igual manera determinara en todo caso cuando se llegue al final del tratamiento. (16)

1.9 FROTIS.

Se denomina frotis a la extensión que se realiza sobre un portaobjetos (laminilla), de una muestra biológica o la muestra proveniente de un cultivo, con el objeto de separar lo más posible los microorganismos, la finalidad es hacer una capa fina y homogénea que permita la fácil identificación con imágenes claras y nítidas de las partículas y evitar la agrupación o grumos de los mismos que provoque una difícil imagen y se pierda nitidez y claridad. Este frotis debe ser posteriormente fijado al portaobjetos (vidrio) para poder aplicar los métodos habituales de tinción que permitan la observación al microscopio de las bacterias sin que la muestra sea arrastrada en los sucesivos lavados. La fijación de una extensión bacteriana hace que las bacterias queden inactivadas y adheridas al vidrio alterando lo menos posible la morfología bacteriana y las probables agrupaciones de células que pudieran existir. (20)

CAPÍTULO 2 PROPUESTA DE TÉCNICA PARA BACILOSCOPIA EN ESPUTO.

Una investigación por baciloscopía de *M. tuberculosis* en muestra de esputo, la metodología debe constar de las siguientes etapas.

- 1.- Recolección de muestras.
- 2.- Registro de información y datos del paciente.
- 3.- Preparación y acondicionamiento de material, reactivos y equipo.
- 4.- Digestión y descontaminación de la muestra.
- 5.- Preparación de frotis para el examen microscópico.
- 6.- Examen microscópico del frotis.
- 7.- Evaluación del Control de calidad.

2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRA.

Dado el alto grado de contagiosidad que representa el realizar la toma de muestra de esputo en condiciones no adecuadas, se solicita al paciente que remita tres muestras al laboratorio clínico, proporcionándole la información respecto a la forma en la que deberá de toser a fin de estimular la expectoración desde la parte inferior del tracto respiratorio, en el caso en el que no presente expectoración espontánea se le explica que puede inducirla con aerosol de suero fisiológico. La recolección tendrá que realizarse en el domicilio del paciente y la entrega de muestras corresponderá a la primera expectoración matinal de por lo menos tres días consecutivos. (la recomendación es una muestra por día)

Al paciente se le proporciona anticipadamente el envase adecuado, el cual deberá ser rígido, de boca ancha y plástico transparente, con tapa de rosca, que cierre herméticamente, fácilmente destructible por combustión y deberá estar rotulado con el nombre del paciente.

Características de la muestra de esputo. La muestra adecuada es la que proviene del sitio de la lesión, en cantidad suficiente, recolectada en el envase adecuado y conservada correctamente, en el caso de la muestra de esputo, el volumen debe ser un mínimo de 3 mL, aunque el volumen requerido al paciente es de 5mL, sin embargo el volumen recomendable para una buena investigación de tuberculosis es entre 5 mL y 7mL. (16)(25)

Criterios para rechazo de muestra. El motivo de rechazo será sólo cuando la muestra presenta las siguientes características:

- Envase contenedor sin rotular
- Muestra con evidencias de descomposición

- Muestra Derramada

Manejo de muestra. La muestra debe permanecer siempre en refrigeración a 4°C y protegida de la luz hasta el momento de su proceso. Por lo que deberá ser entregada una cada día.

2.2 REGISTRO DE INFORMACIÓN Y DATOS DEL PACIENTE.

Se propone el llevar dos bitácoras; una para ser utilizada por el microscopista a cargo y otra para el uso del laboratorio en general.

Registro de datos en bitácora para uso del laboratorio:

- | | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| 1. No. consecutivo en el laboratorio. | 5. Sexo; Fem. o Masc. | 9. Seguimiento. |
| 2. Fecha. | 6. Edad. | 10. Número de muestra. |
| 3. Nombre y apellido. | 7. Servicio que solicita el estudio. | 11. Resultado. |
| 4. No. de afiliación en el Instituto. | 8. Diagnóstico. | 12. Firma. |
| | | 13. Observaciones |

Registro de datos en bitácora para uso del microscopista:

- | | |
|---------------------------------------|-------------------|
| 1. No. consecutivo en el laboratorio. | 11. Resultado. |
| 2. Fecha. | 12. Firma. |
| 3. Nombre y apellido. | 13. Observaciones |
| 4. Sexo; Fem. o Masc. | |
| 5. Edad. | |
| 6. Servicio que solicita el estudio. | |
| 7. Diagnóstico. | |
| 8. Seguimiento. | |
| 9. Número de muestra. | |
| 10. Aspecto. | |

2.3 PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE REACTIVOS, EQUIPO Y MATERIAL.

REACTIVOS UTILIZADOS	
Digestión - descontaminación	<ul style="list-style-type: none">▪ Solución mucolítica descontaminante N-acetilcisteína /NaOH 2% (HYSEL)▪ Solución buffer fosfatos pH 6.8 (HYSEL)
Tinción de Ziehl - Neelsen.	<ul style="list-style-type: none">▪ Solución de tinción fucsina fenicada de Ziehl-Neelsen. (HYSEL, Colorante para bacilos No. 1 y para bacteriología en general, Cat. 6151)▪ Solución decolorante alcohol-ácido. 70%, ORTH (HYSEL, Líquido decolorante para tinción de bacterias alcohol ácido resistentes, Cat. 852)▪ Solución de contraste azul de metileno al 0.3% de Ziehl-Neelsen. (HYSEL, Colorante para bacilos No.1 y para bacteriología en general, Cat. 6154)
Cepas control	<ul style="list-style-type: none">▪ Cepa para control positivo <i>Mycobacterium Segmentatis</i> CIP 7326.▪ Cepa para control negativo <i>Escherichia Coli</i> ATCC 19420.
Otros	<ul style="list-style-type: none">▪ Aceite mineral de inmersión. (Golden Bell, materiales y abastos especializados, No. de código: 80100) 100mL $\delta = 0.923\text{gr/cc}$.▪ Alcohol etílico, (grado analítico, alcohol etílico 96°, ALFIMEX. Registro de salubridad 15C96 S.S.A.)▪ Hipoclorito de sodio al 6% como desinfectante. (Cyochemicalm, Clave IMSS:350.107.0050)

EQUIPO DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE BACILOSCOPIA.

Para esta metódica propuesta el equipos con el que se cuenta y sus características son:

CENTRIFUGA.- Que trabaja a 3000 rpm por 30 min.

MICROSCOPIO.- Spencer con objetivos de 4x, 10x, 45x, 100x.

AUTOCLAVE.- Que esteriliza a 121 °C por 30 min. (Falcon)

MATERIAL NECESARIO EN LA TÉCNICA DE BACILOSCOPIA

- | | |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. Porta láminas para frotis preparados.2. Envase para muestra esputo.3. Asa bacteriológica de platino con diámetro interior de 3 mm.4. Mechero Bunsen.5. Pinzas.6. Envase estéril para la recolección de esputo. (de plástico, transparente y rígido, con boca ancha y tapa de rosca)7. Contenedores metálicos con tapa para desperdicios y material.8. Caja de láminas grabadas para frotis. | <ol style="list-style-type: none">9. Gradillas metálicas.10. Reloj cronometro.11. Puente bacteriológico.12. Portaobjetos.13. Gasas no estériles de 10 cm x 10 cm.14. Tubos de ensayo con capacidad de 50 mL. (con tapón de rosca)15. Pipeta Pasteur de 3 mm de diámetro y longitud aproximada de 28 cm, provistas de pro-pipetas de hule.16. Algodón. |
|---|--|

2.4 ASEGURAMIENTO DE CALIDAD PARA LA TÉCNICA DE BACILOSCOPIA.

El aseguramiento de la calidad en esta técnica propuesta de baciloscopía comprende las siguientes etapas: preparación de la muestra de esputo, preparación del frotis, tinción del frotis, el examen microscópico del frotis.

- **Proceso de Digestión-descontaminación.**

Se propone hacer más eficiente el proceso de digestión-descontaminación de muestras que son sembradas en medio de agar sangre y agar chocolate incubadas de 35 a 37°C durante 5 días, evaluando mediante observación el crecimiento bacteriano, hasta un 5% es aceptable y se considera un buen proceso de descontaminación de la muestras. (26)

- **Preparación del frotis.**

Se propone que la evaluación de la calidad del extendido de la muestra (frotis), se lleve a cabo a partir de considerar el cumplimiento de las siguientes características: película fina y homogénea, dimensiones; de 1 cm de ancho por 2 cm de largo, y que la muestra sea colocada al centro del portaobjetos. (16)

- **Tinción del frotis.**

Para el aseguramiento de la calidad en la tinción del frotis se propone establecer los controles que permitan verificar que el proceso de tinción es llevado adecuadamente, para se requiere que se use una cepa micobacteriana tipo *Mycobacterium smegmatis*, (micobacteria de crecimiento rápido con un grado patológico bajo) que sirva de control positivo y una cepa de *Escherichia coli* que sirva de control negativo, ambas en suero fisiológico o agua destilada con turbidez 1 McFarland y preparadas al momento de usarse para posteriormente llevar a cabo la tinción. (22)(26) Para evaluar el contraste entre los bacilos y el resto de la laminilla, se recomienda incorporar el frotis de las cepas control diario y llevar el registro acerca de los hallazgos encontrados entre los diferentes controles y las muestras observadas, de esta manera se verificaría la correcta realización de la técnica de tinción. (24)

- **Examen microscópico.**

La evaluación de la conformidad con los controles establecidos, se llevaría de acuerdo por comparación entre la baciloscopía de una cepa control [una micobacteria tipo *M. smegmatis* (positiva) y una cepa bacteriana (negativa)], llevando registros de las observaciones, por un lado los bacilos ácido-alcohol resistentes (micobacterias) se deberán de ver de color rojo magenta (tanto la cepa control positivo como la muestra del paciente), mientras que los bacilos de (*E. Coli*) control negativo, se deberán observar de color azul.

2.5 MEDIDAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO MICROBIOLÓGICO.

RECOMENDACIONES GENERALES. Capacitar al personal sobre las normas de seguridad y buscar la realización del trabajo de manera más segura, hacer conciencia sobre las medidas de prohibición en para beber, fumar y aplicarse cosméticos o crema de manos dentro de las áreas de trabajo, lavarse las manos al salir y entrar al laboratorio, el uso de bata (o uniforme específico), empleo de dispositivos de protección facial ante el riesgo de salpicaduras o formación de aerosoles y uso de guantes durante todo el tiempo de proceso de manipulación de muestras.

MEDIDAS PARA REDUCIR LA FORMACIÓN DE AEROSOLES. Manejo adecuado de centrifugas, no obstruir o frenar el rotor, centrífugas con tapa, no llenar en exceso los tubos, utilizar tubos con rosca preferentemente, no verter líquidos bruscamente y tener precaución al abrir recipientes de muestras, se recomienda en todo caso, realizar esta técnica en cabina de

bioseguridad clase II. (en caso de no contarse con este equipo, se debe disponer de un área que este bien delimitada e independiente, con iluminación y ventilada)

Es importante señalar que en esta técnica propuesta, la etapa de mayor riesgo por la producción de aerosoles es durante el batido o homogenización de la muestra, el proceso de digestión y centrifugado y durante el extendido, por lo tanto es indispensable que se cumplan todas las medidas de seguridad antes señaladas.

MEDIDAS PARA EVITAR EXPOSICIONES ACCIDENTALES. No pipetear con la boca, no encapuchar agujas manualmente, protegerse heridas o erosiones y emplear los mecanismos de barrera ya mencionados.

LIMPIEZA Y ELIMINACIÓN DE RESIDUOS. Limpieza de la superficie de trabajo antes de iniciar el procesamiento de muestras y al terminar, al ocurrir cualquier derrame limpiar con paño húmedo de una disolución de hipoclorito de sodio al 6 %.

Desinfección; inactivación del material potencialmente infeccioso: Depositar en un recipiente impermeable que contenga una disolución de hipoclorito de sodio al 0.6%, todos los desechos deben ser sumergidos totalmente por 30 min.

Esterilización del material potencialmente infeccioso: Colocar el material infeccioso en recipientes resistentes a temperaturas mayores a 160° C y esterilizar en autoclave a 121° C durante 30 min.

Eliminación del material: Una vez desinfectado y esterilizado el material de desecho infeccioso debe ser depositado dentro del contenedor de desecho final marcado como material esterilizado para desecho y posterior debe ser incinerado. Sí existen desechos punzo-cortantes depositarlos en un contenedor rígido e impermeable marcado como material punzo-cortante y debe disponerse para su posterior incineración.

2.6 TRATAMIENTO DE DIGESTIÓN-DESCONTAMINACIÓN DE MUESTRAS.

Aun cuando el estudio microscópico mediante tinción de Ziehl-Neelsen a partir de la muestra directa (en la evaluación inicial de pacientes graves), es necesario recordar que la sensibilidad de la detección aumenta cuando se realiza todo el proceso a partir de una muestra previamente procesada, ya que ésta ha sido sujeta a una concentración por centrifugación, lo cual permite la observación de bacilos ácido alcohol resistentes más fácilmente. (17)

El proceso de descontaminación tiene como propósito; mucolizar la muestra, eliminar parte de la flora comensal acompañante, concentrar la muestra, aislar las micobacterias y facilita el estudio microscópico. Existen diferentes métodos de descontaminación efectivos que se diferencian según el tipo de solución descontaminante-mucolítica usada. En función en que fueron obtenidas, conservadas y al grado de contaminación de las muestras es que se puede seleccionar el método de descontaminación. El método menos agresivo y más conveniente es el que emplea NALC-NaOH en donde el N-acetil-L-cisteína cumple la función mucolítica y el NaOH al 2% funciona como descontaminante. Este método seleccionado, finaliza con una etapa de concentración por centrifugación, etapa crítica para reducir la eventual dilución de la muestra con la solución NALC-NaOH durante el procesamiento. Una vez obtenido el sedimento se procede a la realización del frotis. (2)(3)(7)(17)(18)(19)

2.7 DIGESTIÓN-DESCONTAMINACIÓN CON N-ACETIL-L-CISTEÍNA-NAOH 2%.

TÉCNICA DE DIGESTIÓN-DESCONTAMINACIÓN CON N-ACETIL-L-CISTEÍNA-NAOH 2%
• Colocar de 3 a 5 mL de la muestra con ayuda de una pipetas Pasteur con pro-pipeta de jebe, en tubo de centrifuga de 50 mL con tapa de rosca.
• Agregar al tubo con la muestra, un volumen igual de solución mucolítica-descontaminante. (N-acetil-L-cisteína /NaOH 2%).
• Homogeneizar la mezcla suavemente durante 30 segundos. (3 veces)
• Incubar de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente, cuidando de no excederse por más de 20 min. debido a que corre el riesgo de eliminar micobacterias y provocar falsos negativos.
• Después del paso de digestión-descontaminación, agregar buffer hasta un volumen de 50 mL. El buffer fosfato hace menos probable las variaciones bruscas de pH, sirve para lavar la muestra, diluir y neutralizar las sustancias tóxicas y para reducir la densidad de la muestra a modo que la centrifugación sea más efectiva en la sedimentación de las micobacterias.
• Mezclar la suspensión solo por inversión del tubo.
• Concentrar la muestra por centrifugación a 3.000 rpm (o fuerza de g) durante 15 a 20 min. Posteriormente decantar el sobrenadante cuidadosamente en un recipiente a prueba de salpicaduras que contenga una solución desinfectante de hipoclorito de sodio.
• Realizar el frotis empleando un asa bacteriológica.
• Guardar el resto del sedimento en refrigeración durante 7 días. (17)

2.8 PREPARACIÓN DEL FROTIS.

Toda técnica de tinción exige una preparación previa del frotis con los siguientes pasos:

2.8.1 Identificación de la muestra-portaobjetos.

En cada portaobjetos se escribirán los datos correspondientes a cada muestra; código de laboratorio, número de serie e identificación de la muestra consecutiva. (1^{ra}, 2^{da}, 3^{ra}) El frotis debe realizarse en portaobjetos nuevos, debe marcarse en la parte superior o inferior con marcadores de punta de diamante y cuidando la calidad de la escritura para facilitar la identificación.

2.8.2 Extensión.

Dentro de un área estéril ya sea en campana o en un área cercada por un mechero, con un asa de platino previamente flameada y enfriada, se toma un poco de la muestra concentrada y se coloca sobre el portaobjetos, se extiende en el portaobjetos formando una capa fina y uniforme de aproximadamente 1,5 cm. de ancho por 2.0 cm. de largo y al centro del portaobjetos (frotis). Si el producto de la descontaminación-concentración es sólido o semisólido, depositar una gota de agua destilada, solución salina o suero fisiológico en el portaobjetos, y con ayuda del asa de platino previamente flameada y enfriada, se procede a realizar la suspensión. En el caso de un cultivo puro se toma una pequeña cantidad de cultivo y se procede de la misma manera, en el caso de ser muy sólido o concentrado, se procede de la misma manera ya descrita y se realiza el extendido de la misma forma mencionada anteriormente. Al realizar el frotis tener cuidado de no colocar demasiada muestra en el asa, pues formaría una capa gruesa de extendido y dificultaría la observación al microscopio.

2.8.3 Desecación.

Se deja secar a temperatura ambiente en una superficie limpia o manteniendo el portaobjetos en alto y a un lado de la flama del mechero.

2.8.4 Fijación.

La fijación tiene por objeto adherir los gérmenes al portaobjetos para evitar el arrastre de estos con el lavado o los colorantes. Este principio se lleva a cabo mediante la coagulación de proteínas de los microorganismos cuando la extensión esta completamente seca.

En Microbiología el agente fijador es el calor, una vez seca la extensión (frotis), se pasa el portaobjetos dos o tres veces por la flama del mechero con la extensión hacia arriba. El portaobjetos debe notarse caliente pero no quemar cuando se coloca en el dorso de la mano. Una vez fijada la preparación se deja enfriar antes de proceder a la coloración pues de lo contrario se precipitaría el colorante en la laminilla. En algunos casos se puede realizar la fijación mediante el empleo de fijadores químicos tales como el alcohol metílico o etílico, dejándolo en contacto dos o tres minutos con la muestra en la laminilla para posteriormente eliminar el exceso. Una vez preparada y fijada la extensión, se sigue con la tinción. (16)

2.9 TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN

Los frotis fijados son colocados sobre el caballete de tinción, preferentemente en el orden de serie y con el lado del extendido de muestra hacia arriba. Entre cada frotis debe haber una separación mínima de 2 cm y nunca debe haber contacto entre ellos.

1.- **Coloración específica:** Se cubren los frotis con fucsina fenicada. Se calientan por debajo de la lámina con la llama de un mechero Bunsen, una lámpara de alcohol o una mecha de algodón impregnada de alcohol hasta que se observe la emisión de vapores blancos; retirar la fuente de calor, repetir dos veces más la misma operación; cuidar que el colorante no se derrame, no se seque o hierva. Si esto ocurre, agregar más fucsina a la preparación del portaobjetos. El tiempo de contacto con la fucsina debe ser entre 5 y 10 minutos. Posteriormente se enjuagan los frotis con un chorro suave de agua para remover el exceso de colorante y enseguida se remover el exceso de agua de enjuague de los portaobjetos.

2.- **Decoloración:** Cubrir los portaobjetos con alcohol ácido dejándolo actuar por 3 minutos para la acción de decoloración. Esta operación se repite las veces que sea necesarias hasta que la preparación en su parte menos espesa quede incolora.

3.- **Coloración de fondo o tinción de contraste:** Los portaobjetos se cubren en la parte del extendido con azul de metileno por 1 minuto como mínimo, pasado este tiempo se lavan con agua corriente suavemente para retirar el exceso de colorante, se limpian los portaobjetos en su cara posterior al frotis o preparación con algodón impregnado de alcohol, se secan los portaobjetos a temperatura ambiente y en un área limpia y ventilada. (16)

2.10 EXAMEN MICROSCÓPICO DE LAMINILLAS.

En la baciloscopía es necesario el uso de un microscopio binocular con objetivos estándar, uno con aumento de 40x y un objetivo de inmersión con aumento de 100x, además de contar con oculares de aumento moderado de 10x.

Precauciones y mantenimiento.

Con todo el equipo de laboratorio se debe tener cierto cuidado que permita mantenerlo en buenas condiciones, el microscopio en específico no es la excepción.

- Cuando no este en uso, debe permanecer en su caja o en su lugar designado totalmente cubierto para protegerlo del polvo, calor y humedad.
- El sistema óptico del microscopio constantemente está amenazado por el crecimiento de hongos, pero este crecimiento puede ser inhibido mediante la incidencia de luz de una lámpara de 20 a 40 watts durante el tiempo que no se utilice.
- No se deben tocar nunca las lentes con las manos.
- Nunca dejar preparaciones sobre la platina del microscopio cuando no este en uso.
- No forzar nunca los tornillos giratorios del macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador.
- Para cambiar de objetivo emplear siempre el revólver.
- Después de utilizar el objetivo de inmersión siempre deberá limpiarse el aceite que queda en el objetivo empleando un paño especial para óptica. Si el aceite se ha secado o pegado al objetivo se deberá limpiar con una mezcla de alcohol-cetona en una proporción 7:3 con la precaución de no añadir en exceso estos disolventes.
- Nunca cambie de objetivo mientras esté observando ya que produciría rozamiento de la lente con la muestra.
- Al finalizar de trabajar se debe poner el objetivo de menor aumento en posición de observación.
- Entre la lectura de una laminilla y otra, siempre limpiar el objetivo de inmersión.
- Todos los días deben limpiarse los objetivos, oculares, condensador y fuente luminosa, con un papel para lentes. (22)(23)

Forma correcta de realizar lectura de laminillas.

- Colocar la lámina teñida sobre la platina, con el condensador en su posición más elevada y ajustar la fuente luminosa para obtener el máximo de luz mirando por el ocular, utilizando el objetivo estándar de 40x.
- Seleccionar una zona que contenga más preparación o células antes de poner la gota de aceite de inmersión.
- Depositar una gota de aceite de inmersión únicamente sobre la preparación del frotis teñido para aumentar el poder de resolución. No tocar la lamilla con el objetivo de inmersión para prevenir contaminación con BAAR.

Uso del objetivo de inmersión del microscopio.

- Bajando lentamente el objetivo de inmersión con el tornillo macrométrico, se formará una película de aceite entre el objetivo y la lámina. Completar el enfoque utilizando el tornillo micrométrico. Se debe evitar que el objetivo toque la lámina. (16)
- Algunos aceites de inmersión pueden disolver la fucsina, lo que hace palidecer rápidamente la coloración de Zielh-Neelsen. Se recomienda utilizar hidrocarburos sintéticos y polímeros avanzados con índice de refracción de 1.5, puesto que no se secan, no endurecen y no son disolventes.

Examen microscópico.

- Los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) se tiñen de color rojo o rosa sobre un fondo de contraste azul. Su forma es muy variable (filamentos cortos ligeramente curvos o filamentos cortos ligeramente curvos o filamentos); pueden estar teñidos de manera uniforme o desigual y pueden ser más o menos granulados. Pueden estar aislados, en parejas o agrupados y se presentan típicamente como bastoncitos largos, delgados o curvados.
- La lectura se hace de manera sistemática y estandarizada. Se recomienda iniciar en el extremo izquierdo de la laminilla y hacer el recorrido de la platina hacia el lado derecho, y de arriba hacia abajo, para continuar de derecha a izquierda y de arriba hacia abajo. En el eje longitudinal de un frotis de 2 cm. hay alrededor de 100 campos microscópicos de inmersión y 3 líneas del frotis examinadas corresponden a 300 campos microscópicos contados.
- El microscopista debe tomar por lo menos 5 minutos para leer 100 campos y, cuando trabaja de tiempo completo, no se recomienda leer más de 10 o 12 frotis de una sola vez, deberá tomar un descanso de por lo menos 15 min entre una serie y otra.

2.11 INFORME DE RESULTADOS DE LA BACILOSCOPIA.

La información sobre el número de bacilos encontrados es muy importante, puesto que tiene relación con el grado de contagiosidad del paciente y con la gravedad de la enfermedad. Por lo que los resultados deben informarse de manera no solamente cualitativa, sino también semicuantitativa, para lo cual se recomienda seguir el siguiente cuadro. (16)

Número de BAAR	Registro
Sin presencia de BAAR en 100 campos	Negativo
De 1 a 9 BAAR en 100 campos	Número real de BAAR
De 10 a 99 BAAR en 100 campos	Positivo +
De 1 a 5 BAAR en 50 campos	Positivo ++
> 10 BAAR en 20 campos	Positivo +++

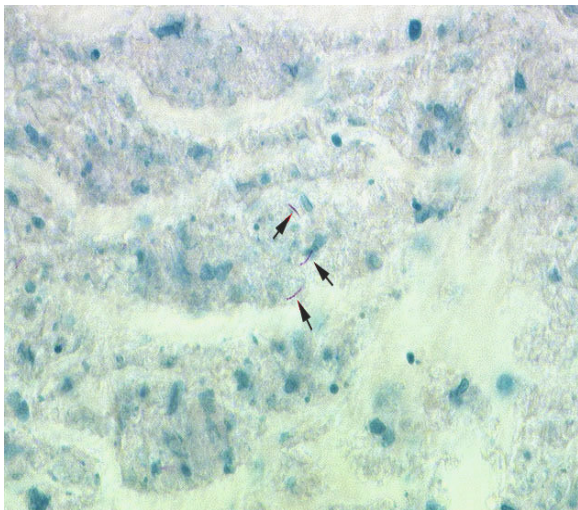


Imagen de lo que es un ejemplo claro del parámetro de número real de BAAR.

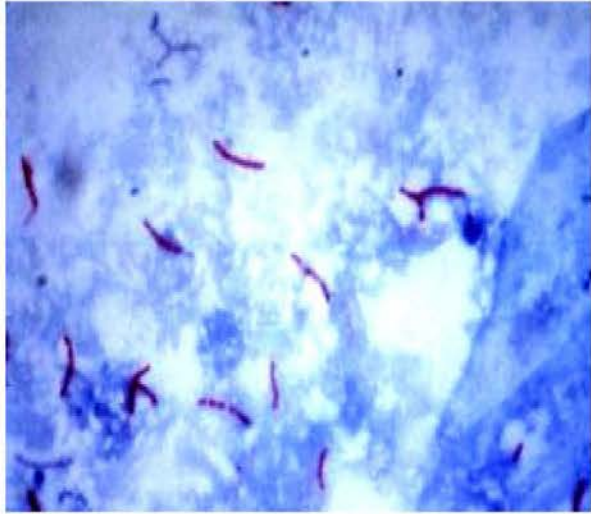


Imagen de un frotis mostrando un ejemplo de un BAAR positivo con una cruz.

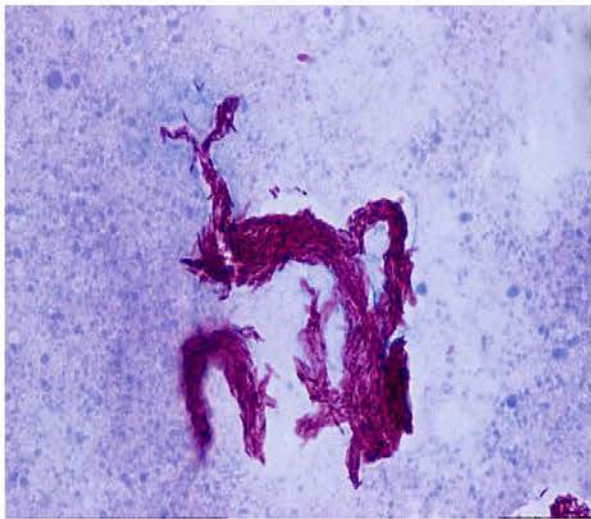


Imagen de un frotis mostrando un ejemplo de un BAAR positivo de dos cruces.

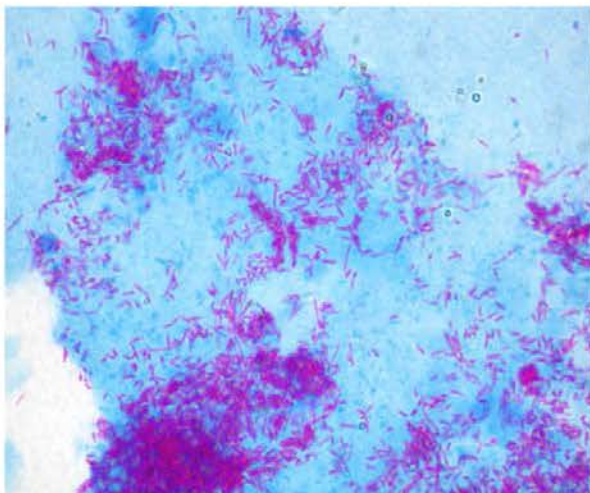


Imagen de frotis mostrando un ejemplo de un BAAR positivo de tres cruces.

DISCUSIÓN

La baciloscopía sigue siendo una técnica microbiológica indispensable dentro de los programas de control de la Tuberculosis, aún más en los países de escasos recursos económicos, esta siendo la única técnica microbiológica de diagnóstico tanto para laboratorios como para hospitales o clínicas rurales. En el caso del laboratorio clínico del Hospital General de Zona No. 26 del IMSS sucede lo mismo.

La presente propuesta de estandarizar esta metodología ha sido guiada por las más recientes investigaciones sobre el tema así como por una selección de recomendaciones y normas, propuestas por instituciones nacionales e internacionales especializadas en el control y estudio de la tuberculosis.

La revisión de todas y cada una de las etapas del proceso de investigación y análisis de baciloscopía en muestras de esputo, nos llevó a realizar mejoras a lo largo y ancho del proceso, lo cual a continuación se presenta.

1.- Recolección de muestras de esputo para baciloscopía.

En investigaciones sobre la técnica de baciloscopía se demostró que la sensibilidad de la técnica se incrementa con el aumento en el volumen de muestra, logrando resultados óptimos cuando el volumen va de 5mL a 7mL de muestra.

En el área de bacteriología no se considera motivo de rechazo el que las muestras para baciloscopía sean de mala calidad (principalmente por el alto contenido de saliva), puesto que aún en saliva es posible el hallazgo de bacilos ácido-alcohol resistentes.

Tampoco es razón de rechazo el que las muestras contengan un escaso volumen, ya que existe la recomendación de llevar a cabo un frotis por toma directa, la finalidad es llevar a cabo una detección oportuna de pacientes infectados, para lo antes posible realizar el seguimiento y tratamiento medicamentoso y evitar futuros contagios.

En las muestras con volúmenes muy escasos o con alto contenido de saliva, se corre el riesgo de reportar falsos negativos que conlleva a que el paciente no reciba el tratamiento adecuado y provocando contagio de otras personas a falta de un tratamiento.

2.-Registro de información y datos del paciente.

Es de suma importancia recabar los datos del paciente así como la información pertinente al respecto de estado clínico de salud o probable diagnóstico, ya que para el laboratorio significa un preámbulo entre la búsqueda y lo observado en el microscopio con la situación clínica en la que se encuentre el individuo, evitando trabajo innecesario, brindando mayor seguridad y satisfacción por resultado óptimo según el criterio beneficio clínica-laboratorio.

3.- Preparación y acondicionamiento de material, reactivos y equipo.

Entre las causas de error más comunes en el laboratorio, se encuentra el debido a la mala condición en la que se encuentran los reactivos, principalmente por la formación o contenido de cristales de fucsina que pueden provocar confusión a los microscopistas que no tengan suficiente experiencia para diferenciar a los bacilos de los demás artefactos, además, el mal estado del colorante azul de metileno provoca errores a causa de una deficiente coloración ocasionando un pobre contraste entre la coloración del bacilo y el área del frotis restante, por lo que se recomienda asegurar que los reactivos presenten las condiciones recomendables para la tinción.

4.- Digestión y descontaminación de la muestra de esputo.

La mayor aportación de este trabajo, es la incorporación de este proceso a la técnica de baciloscopía, ya que resulta fundamental para la recuperación y aislamiento de bacilos, aún cuando algunos autores aseguran que existe una pérdida de 10^4 bacilos por mililitro. Sin embargo esta pérdida de bacilos resulta mínima en relación a la cantidad que pueden ser recuperados por el proceso de concentración, después de realizar un gran número de muestras procesadas, se ha podido confirmar que el mayor beneficio está en la recuperación y aislamiento de bacilos que por la pérdida de los mismos. Otra ventaja es que con este método se logran, la eliminación de falsos positivos (FP), producidos por restos de comida en el esputo, fibras de algodón, polen y otros artefactos contaminantes.

5.- Preparación de frotis para el examen microscópico de *M. tuberculosis*.

Las deficiencias en la técnica de coloración de Zielh-Neelsen influyen en la calidad de la lectura y son causa de resultados Falsos Positivos (FP) y Falsos Negativos (FN).

- En diversas investigaciones relacionadas con el tema, se ha podido observar que aproximadamente 46 % de los Falsos Positivos ha sido relacionado con deficiencias en la coloración, una de ellas es la deficiente decoloración de la preparación debida principalmente a la calidad del alcohol ácido.
- Por otra parte, los FN han sido generalmente asociados con extendidos muy finos, tiempo prolongado en el proceso de decoloración de la preparación o por un pobre calentamiento de la fucsina, de ahí la importancia de respetar los tiempos de coloración y de decoloración propuestos en este trabajo.
- La utilización de la técnica de coloración de Ziehl–Neelsen en la microscopía es rápida, económica y sencilla, la sensibilidad varía dependiendo del tipo de muestra y la micobacteria involucrada, ya que como regla deben existir entre cinco mil a diez mil bacilos por mL de expectoración para obtener resultados entre un 50 a 80% de posibilidades de ser detectados al microscopio, sólo cuando el numero de bacilos alcanza una concentración mayor a 100.000 bacilos por ml. de expectoración, podemos esperar que las baciloscopía sea consistentemente positiva.

6.- Examen microscópico de laminilla.

Específicamente en este apartado cabe mencionar que al seguir las recomendaciones acerca de la forma de realizar la lectura de las laminillas anteriormente expuesta y al correcto funcionamiento del microscopio, se pueden perfeccionar esta técnica.

7.- Aseguramiento de la calidad.

- Los procedimientos de aseguramiento de la calidad expuestos anteriormente en este trabajo en las 4 etapas fundamentales de la técnica de baciloscopía, así como la sugerencia de que sean implementados día a día, serán los factores decisivos de conseguir resultados de la mas alta calidad y confianza.
- El concepto de control de calidad en esta propuesta, radica principalmente en el establecimiento de un sistema de comparación entre controles de cepa positiva y cepa negativa con la muestra del paciente en estudio, que permita eficientemente detectar las deficiencias de la metodología implementada y que al corregirlas mediante planes de acciones (preventivos y correctivos) se asegure que los procesos y sus resultados sean confiables, reales y verdaderos.

CONCLUSIONES

Al finalizar el presente trabajo con las observaciones de adecuación y las propuestas hechas así como de las sugerencias de implementaciones a la metódica de baciloscopía, se sigue recomendando que se trabaje por la estandarización del trabajo en la realización de la técnica para lograr una mayor sensibilidad y especificidad de ésta, la finalidad es lograr entre un 80% y 100% de resultados confiables, reales y verdaderos. (25)

Es también de suma importancia considerar a todo el personal de laboratorio encargado de la realización e interpretación de la baciloscopía, para que tomen en cuenta estas recomendaciones propuestas y lograr con ello la unificación de criterios, la sensibilización, compromiso y responsabilidad para el trabajo que realizan y que en la toma de conciencia recapaciten nuevamente que esta de por medio la salud de las personas.

Se busca hacer un llamado a la atención sobre los conceptos relacionados con la calidad y el aseguramiento de la calidad en los laboratorios de prueba, como son:

- * La recolección de muestra es la parte fundamental del proceso de estandarización de la técnica, no perder de vista las características de volumen, calidad de la muestra, el frasco contenedor, la identificación con el nombre del paciente y número de recolección y los datos al respecto del lugar de donde proviene o del sitio de lesión.

- * Los equipos en excelentes condiciones, funcionamiento adecuado, debidamente calibrados y acondicionados.

- * Que la elección del método de digestión-descontaminación (NALC-NaOH) propuesto en este trabajo se hace en función a su capacidad de digerir y descontaminar, sin llegar a ser demasiado agresivo para las micobacterias, además de ser el método más económico por su bajo costo y por ser una metodología bastante práctica.

El control de calidad como tal, esta sujeto básicamente en esta propuesta en realizar un comparativo microscópico entre la tinción de las cepas control y la muestra del paciente en estudio, de tal manera que se logren identificar deficiencias por comparación entre los frotis, eliminando así los errores en la interpretación al microscopio y erradicar fallas en la lectura de las laminillas, ya que el resultado del examen microscópico se reporta de manera semicuantitativa en cruces, según la recomendación de la **Organización Panamericana de la Salud contra la Tuberculosis**.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Secretaría de Salud. Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades. *Práctica Medicina Efectiva. "Tuberculosis Pulmonar"*. Enero 2000, Volumen 2 – Número.
- 2.-Alberto Delgado Iribarren. Madrid España 1994. *Laboratorio de Microbiología*. Ed. Mc Graw Hill. 213-230 pp.
- 3.-Elmer W. Koneman, M. D. Buenos Aires, Argentina 1999. *Diagnostico Microbiológico*. Ed. Médica Panamericana. 868-879 pp.
- 4.- Sánchez Vega J Trinidad. *Fundamento de Microbiología y Parasitología Médica.* México, D.F. 2003. pp. 358-365.
- 5.- Stuart Walter T. *Microbiología*. Mc Graw Hill. Interamericana. México 2000.
- 6._Ministerio de Salud. *El Laboratorio de Salud Pública frente a la emergencia de la Tuberculosis Resistente*. Lima, Perú 2001. Documento Técnico No. 23.
- 7.- Bailey & Scoh. Buenos Aires, Argentina 2004. *Diagnostico Microbiológico*. Ed. Médica Panamericana. 562-584 pp.
- 8.- World Health Organization. 2001 Global tuberculosis Control. WHO Report 2001.
- 9.-Secretaría de Salud. Subsecretaría de Prevención y Protección de la Salud. *Programa de acción TUBERCULOSIS*. México 2001.
- 10.-Organización Panamericana de la Salud. Informe el Control de la Tuberculosis en las Américas. Washington, D.C. OPS, 2000.
- 11.-Secretaria de Salud. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud. DOF Septiembre 2005.
- 12.- Dr. Emilio Rosenstein Ster. *Diccionario de Especialidades en Análisis Clínicos*. 8ª: Ed. PLM Mex. 1994.

- 13.-Murray P, Drew, Kobayashi G, Thompson J. *Microbiología Médica*, Mosby-Year Book de España S. A. 1992. pp. 786-799.
- 14.-M De la Parte Pérez, MP Hurtado y M Rivera. *Tuberculosis en el Nuevo Milenio*. Revista de la Facultad de Medicina 2001, Volumen 24 Número 2, (104-119).
- 15.-Adriana Guevara G, Aníbal Juárez H y Roberto Zenteno C. *Tuberculosis y la importancia de incorporar nuevas metodologías diagnósticas*. MEDUNAB 2003, Volumen 6, Número 16, (46-51).
- 16.-OMS. Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias. GUÍA TÉCNICA para los países con escasos recursos económicos. *Diagnóstico de la tuberculosis por examen microscópico directo de la expectoración*. París, Francia 2000. Quinta Edición.
- 17.- Patricia González A. *Optimización del diagnóstico microbiológico en infecciones por micobacterias*. Rev Chil Enf Respir 2004; 20: 162-185.
- 18.-Raúl Romero C. *Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas*. México 2001, Ed. Médica Panamericana pp. 382-388.
- 19.-F J Broker. *Manual de técnicas de Microbiología Médica*. Zaragoza, España 1972. Ed. Acribia S.A. pp. 243-256.
- 20.- Mejoría continua de la calidad: guía para los Laboratorios clínicos de América Latina Ed. Médica Panamericana. México, 1995.
- 21.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical Laboratory technical procedure manuals – Second Edition. Approved Guideline. NCCLS document GP2-A2 (ISBN 1-562338-156-3) NCCLS, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, P.A. 19085, 1992.
- 22.- R Díaz. *Prácticas de Microbiología Médica*. Zamora Barcelona 2004. Ed. Masson. pp.23-27, 42-44.
- 23.- Clinical and Laboratory Standards Institute. Laboratory and Identification de Mycobacteria. First edition. Approved Guideline. CLSI documento M48-P. CLSI, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, P. A. 19085, 2007.

24.- John R Warren, Mondira Bhattacharya. *A Minimum 5.0 ml of Sputum Improves the Sensitivity of Acid-Fast Smear for Mycobacterium tuberculosis*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2000. Volumen 16 (1559-1562).

25.- María R Martínez, Ernesto Montoro. *Evaluación del Control de Calidad de la baciloscopia en el diagnóstico de la Tuberculosis en Cuba*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Rev Cubana Med Trop 2006;58(39).

26.- OMS. *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio*. Ginebra 2005.

27.- Fernando Acaide F V. Recomendaciones generales para el control de calidad interno de Microbiología Clínica <http://www.seimc.org/gegmic/doc104/CCI-SEIMC-06.pdf>.

28.- <http://www.microbiologybytes.com/video/Mtuberculosis.html>.

29.- <http://www.clsi.org/source/orders/free/m48-P.pdf>.

30.- McGowan, Jefferies, Turley. *Aparato Respiratorio*. Madrid España 2004. Ed. Elsevier. pp 172-173.

31.- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Using Proficiency Testing to Improve The Clinical Laboratory*. Second edition. Approved Guideline. CLSI document GP27-A2. CLSI, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, P. A. 19085, 2007.

VII. CONCLUSIONES

- Se logró establecer la técnica de desinfección de semillas de *Mammillaria coahuilensis*.
- El mayor porcentaje de germinación de semillas se registró en el medio agua con agar. La viabilidad de las semillas se perdió con el tiempo de almacenamiento.
- La contaminación, la oxidación y la hiperhidratación constituyeron problemas para el desarrollo de las plántulas y limitó la disponibilidad de explantes. El medio Agua con Agar fue el que presentó menos problemas en el desarrollo de las plántulas, pero mayor contaminación.
- Las respuestas morfogénicas observadas fueron la formación de callo, la regeneración de brotes en forma indirecta y la activación de yemas axilares (aréolas florales), siendo un evento poco común, pues en *Mammillaria* solo se había registrado para aréolas espiníferas.
- La organogénesis directa se presentó en los dos tipos de explantes, siendo superior en los laterales que en los apicales.
- El mayor número de brotes generados de *M. coahuilensis* fue en BA 1 mg L⁻¹.
- Los brotes más vigorosos, con color más oscuro, mayor elongación, mayor número de espinas y tubérculos elongados, se presentaron en el tratamiento de BA 0.5 mg L⁻¹.
- La rizogénesis fue directa e indirecta de manera espontánea.
- Se obtuvo el 52.76 % de sobrevivencia de 254 brotes aclimatizados, con lo que se obtuvieron 134 brotes en invernadero.
- Los brotes injertados registraron un 100% de sobrevivencia hasta 7 meses después de injertados.
- **Se establecieron las condiciones experimentales para la propagación *in vitro* de *Mammillaria coahuilensis*.**

VIII. REFERENCIAS

- Aceves J. y J. Hernández. 2000. Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad. *Revista Ciencia Administrativa del Colegio Profesional de Biólogos del Estado de Veracruz*. Pp. 64-69.
- Anicua F. J. y V. B. Rivas. 2000. Micropropagación y evaluación del estatus metabólico *in vitro* de tres especies de Cactáceas Endémicas y Amenazadas o en Peligro de Extinción (*Mammillaria bocasana*, *M. carmenae* y *Echinocactus grusonii*). Tesis de Licenciatura (Biología). UNAM, ENEP-Iztacala, México. 70 p.
- Anónimo. 1997. Técnicas de micropropagación: un ejemplo las orquídeas. Manual del curso Latinoamericano y del caribe. BUAP-UNAM.
- Arias-Montes S. 1997. Distribución General. En: Valles S. C. y L. Rodríguez (Eds.). *Suculentas Mexicanas: Cactáceas*. CVS Publicaciones, S. A. de C. V. México. p 17-25.
- Arias-Montes S., U. Guzmán, M. C. Mandujano, M. Soto, y J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción: una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México), la lista roja (UICN) y CITES. *Cac. Suc. Mex.* 50(4): 100-125.
- Arreola H. 1997. Formas de vida y características morfológicas. En: Valles S. C. y L. Rodríguez (Eds.). *Suculentas Mexicanas: Cactáceas*. CVS Publicaciones, S. A. de C. V. México. p 27-35.
- Ault J. R. y W. J. Blackmon. 1985. *In vitro* propagation of selected native cacti species (Abst). *Hortic. Sci.* 20: 541.
- Becerra R. 2000. Las Cactáceas. *Biodiversitas* 32 (6): 1-5.
- Benítez H. y P. Dávila. 2003. Las cactáceas Mexicanas en el contexto de la CITES. *Biodiversitas* 40(6): 8-11.
- Beyl C. 2000. Getting started with tissue culture –media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. En: Trigiano R. y D. Gray (Eds.). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. Second Edition. CRC Press. New York. p. 21-38.
- Bravo-Hollis H. y H. Sánchez-Mejorada. 1978. Las Cactáceas de México. Vol. I. 2ª ed. UNAM. México D. F. p. 107.

- , 1991. Las Cactáceas de México. Vol. III. UNAM. México D. F. 164-165 p.
- Bravo-Hollis H. 1997. Introducción. En: Valles S. C. y L. Rodríguez (Eds.). *Suculentas Mexicanas: Cactáceas*. CVS Publicaciones, S. A. de C. V. México. p 10-12.
- Bregman R. y F. Bouman. 1983. Seed germination in Cactaceae. *Bot. Jour. Linnean Soc.* 86: 357-374.
- Bhau B. 1999. Regeneration of *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. (Cactaceae) from root explants. *Hortic. Sci.* 81: 337-344
- Caponetti J., D. Gray y R. Trigiano. 2000. History of plant tissue and cell culture. In: Trigiano R. y D. Gray (Eds.). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. Second Edition. CRC Press. New York. p. 11-17.
- Cheema G. y P. Mehra. 1981. Anther culture of a cactus. *Nat. Cactus Succulent J.* 36(1): 8-11.
- Collin H. y S. Edwards. 1998. *Plant Cell Culture*. Bios Scientific Publishers. New York. 310 pp.
- Corneanu M., G. Corneanu y S. Copacescu. 1990. Plant regeneration with somaclonal variability from *Mammillaria* sp. callus. En: Abstracts of the VII th International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Abstract A3-66: 99.
- Corona N. V. y Chávez-Ávila V. 1982. Cultivo de Cactáceas en medios asépticos. *Cac. Suc. Mex.* 27:17-23
- Dabekaussen M., R. Pierik, J. van der Laken y H. Spaans. 1991. Factors affecting areole activation *in vitro* in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. *Hort. Sci.* 46:283-294.
- Damiano C., P. Curir, T. Cosmi y B. Ruffoni. 1986. Tissue culture of *Mammillaria* spp. *Hortic. Sci.* 2(3):804 (Abstr).
- Fay M. y J. Gratton. 1992. Tissue culture of cacti and others succulents: a literature review and a report on micropropagation at Kew. *Bradleya* 10:33-48.
- Franco S. 1997. Legislación y conservación. En: Valles S. C. y L. Rodríguez (Eds.). *Suculentas Mexicanas: Cactáceas*. CVS Publicaciones, S. A. de C. V. México. p 101-111.
- Garcés M. 2003. Desarrollo de las primeras etapas de un protocolo de micropropagación para *Eriosyce aurata* (Pfeiffer) Backeberg (Cactaceae), una especie en estado de conservación vulnerable endémica de Chile. Tesis Magíster en Ciencias

- Agropecuarias. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería forestal. 54 pp.
- Garrido G. M. 1998. Evaluación del Metabolismo Ácido de Crasuláceas en tres especies de cactáceas cultivadas *in vitro* y durante su aclimatización a suelo. Tesis de Licenciatura de Biología. UNAM, ENEP-Iztacala, México. 138 p.
- Giusti P., D. Vitti, F. Fiocchetti, G. Colla, F. Saccardo y M. Tucci. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Horti. Sci.* 95(4):319-332.
- Gratton J. y Fay M. 1990. Vegetative Propagation of Cacti and Other Succulents *in vitro*. En: Pollard J. y M. Walker (Eds.), *Plant Cell and Tissue Culture Methods in Molecular Biology*. Ohio University Press. Columbia. 6:219-225.
- Guzmán V., S. Arias-Montes y P. Dávila. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM. CONABIO. México. p. 119.
- Hernández H. y H. Godínez. 1994. Contribución al Conocimiento de las Cactáceas Mexicanas Amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26:33-52.
- Hunt D. 1992. CITES Cactaceae checklist. Royal Botanic Gardens. Kew, Surrey. 190 pp.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 1999. Superficie de la República Mexicana por Estados.
- IUCN (International Union Conservation of Nature). 1994. Rare, threatened and insufficiently known endemic cacti of Mexico. Botanic Gardens Conservation-Coordinating Body. Threatened Plants Unit. Threatened Plants Committee. July 83. 9 pp.
- Jayasankar S. 2000. Variation in tissue culture. En: Trigiano R. y D. Gray (Eds.). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. Second Edition. CRC Press. New York. p. 387-395
- Johnson L. y R. Emino. 1981. Axillary Meristem Development in *Mammillaria elongata*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106(1):110-113.
- Kadlecek P., I. Tichá, D. Haisel, V. Capkova y C. Schäfer. 2001. Importance of *in vitro* pre-treatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science* 161:695-701.
- Kevers C., F. Thierry, R. Strasser, J. Dommes y T. Gaspar. 2004. Hiperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77:181-191.

- Kolár Z., J. Bartek y B. Vyskot. 1976. Vegetative propagation of the cactus *Mammillaria woodsii* Craig through tissue culture. *Experientia* 32: 668-669.
- León de la Luz J., L. y A. Valiente-Banuet. 1994. Las cactáceas: un recurso natural diverso y predominantemente mexicano. *Ciencia y Desarrollo*. 20(117): 58-65
- Llano A. 1989. Efecto de citocininas y auxinas en embriones de aguacate (*Persea americana* Mill. Raza mexicana) cultivados *in vitro*. Tesis Maestría en Ciencias, especialidad Fruticultura, Universidad de Chapingo. México. 197 p.
- López-Curto M., J. Márquez-Guzmán y G. Murguía-Sánchez. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo de angiospermas: Libro de Laboratorio. 2ª ed. Coordinación de Servicios Editoriales, Facultad de Ciencias, UNAM. México D. F. 178 p.
- Lozoya S. H. 1985. Micropropagación vegetal. *Ciencia y Desarrollo*. 65:63-70
- Malda G., R. Backhaus y C. Martín. 1999a. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 58: 1-9.
- Malda G., H. Suzán y R. Backhaus. 1999b. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Hort. Sci.* 81:71-87.
- Martínez-Vázquez O. y A. Rubluo. 1989. *In vitro* mass propagation of the near-extinct *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada. *J. Hortic. Sci.* 64(1):99-105.
- Mata M., M. Monroy, K. Moebius y V. Chávez. 2001. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:400-404.
- Mauseth J. D. 1979. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cact. Suc. J. (US)*. 51:186-187.
- Minocha S. C. y P. N. Mehra. 1974. Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *Amer. J. Bot.* 61(2): 168-173.
- Moreno E. 1984. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología, UNAM, México. p 103-106.
- Murashige T. y F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.

- Olguín-Santos L. P. 1994. Cultivo *in vitro* de *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae), especie en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México. 85 p.
- Oliveira S., M. Machado, A. Prioli y C. Mangolin. 1995. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 31:47-50.
- Papafotiou M., G. Balotis, P. Louka y J. Chronopoulos. 2001. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65:163-167.
- Pan M. y J. Van Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture –A review. *Plant Growth Regulation* 26: 155-163.
- Pérez-Molphe-Balch E., R. Pérez, E. Villalobos, E. Meza, L. Morones y H. Lizalde. 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 34:131-135.
- Pérez-Molphe-Balch E., R. Ramírez-Malagón, H. Núñez-Palmeras y N. Ochoa-Alejo. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. Pp. 9-14, 71-80.
- Pierik R. 1993. Micropropagation: Technology and Opportunities. En: Prakash J. y R. Pierik (Eds.). *Plant Biotechnology. Commercial prospects and problems. International Science Publisher. New York.* Pp 9-22.
- Poljuha D., B. Balen, A. Bauer, N. Ljubescic y M. Kirsnik-Rasol. 2003. Morphology and ultrastructure of *Mammillaria gracillis* (Cactaceae) *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75:117-123.
- Reyes J. 1997. Cultivo y propagación como plantas de ornato. En: Valles S. C. y L. Rodríguez (Eds.). *Suculentas Mexicanas: Cactáceas.* CONABIO. México. p 69-77.
- Robbins C. (Ed.). 2003. Comercio Espinoso. Comercio y conservación de cactus en el Desierto Chihuahuense. TRAFFIC Norteamérica. Fondo Mundial para la Naturaleza. Washington DC. 143 pp.
- Rubluo A., V. Chávez, A. Martínez y O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biol. Conserv.* 63:163-169.

- Rubluo A. 1997. Micropropagation of *Mammillaria* Species (Cactaceae). En: Bajaj Y. P.S. (Ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech and Micropropagation. 40: 193-205.
- Rubluo A., T. Marín-Hernández, K. Duval, A. Vargas y J. Márquez-Guzmán. 2002. Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Hort. Sci.* 95:341-349.
- Salisbury F. B. y V. W. Ross. 1994. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamericano. México. p. 267-270.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección Ambiental, Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres, Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio, Lista de Especies en Riesgo. *Diario Oficial de la Federación*, 6 de Marzo de 2002, México, D. F.
- Sánchez-Mejorada H. 1982. Problemas en el control del comercio de cactáceas. *Cact. Suc. Mex.* 27:27-30.
- Starling R. y H. Dodds. 1983. Tissue culture propagation of cacti and others succulents. *Bradleya* 1:84-90.
- Steinhart C. R. 1962. Tissue culture of a cactus. *Science* 137(3529): 545-546.
- Stuppy W. y W. Nagl. 1992. Regeneration and propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) via somatic embryogenesis. *Bradleya*. 10:85-88
- Strasburger E., F. Noll, H. Schenck, y A. Schimper. 1986. Tratado de Botánica. 7ª Edición. Ed. Marin. 430 pp.
- Taiz L. y E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. 3th Edition. Sinaver Associates, Inc. Massachusetts. USA. 683 p.
- Tapia-Cruz D. M. 2006. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* (Haworth.) Pfeiffer (Cactaceae), especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura (Biología). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Van Staden J., y A. Harty. 1988. Cytokinins and adventitious root formation. En: Davies, T. D., B. E. Haissig y N. Sankhla (Eds.) Adventitious root formation in cuttings. Portland: Dioscorides Press. p.185-201.

- Villarreal Q. 2001. Listados florísticos de México XXIII. Flora de Coahuila. Instituto de Biología, UNAM, México, D. F. 139 pp.
- Villavicencio-Gutiérrez E., J. J. López-González, O. U. Martínez-Burciaga y A. Cano-Pineda. 2000. Micropropagación de cactáceas ornamentales amenazadas o en peligro de extinción del desierto Chihuahuense. Universidad Autónoma de Chihuahua INIFAP. Pág. 44-56.
- Vyskot B. y Z. Jara. 1984. Clonal propagation of cacti through axillary buds *in vitro*. *Hortic. Sci.* 59(3):449-452.

IX. ANEXOS

ANEXO 1

Mammillaria coahuilensis (Boed.) Moran, Gentes Herb. 8:324,1953

(Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991)

Tallo simple, pequeño, de unos 4 cm de diámetro, con una parte del tallo subterránea, con el ápice aplanado.

Tubérculos dispuestos en 8 y 13 series espiraladas, flojamente dispuestos, con jugo lechoso, prominentes, hasta 12 mm de longitud, de sección triangular.

Axilas con algo de lana. **Aréolas** elípticas, al principio lanosas, después desnudas. **Espinas radiales**

normalmente 16, de 6 mm de longitud, las de la parte superior de la areóla más cortas, delgadas, algo suaves, de color blanco grisáceo, extendidas horizontalmente, radiales en forma de estrella. **Espina central** 1, de unos 6 cm de longitud, recta, acicular, de color



castaño, ligeramente pubescente. **Flores** campanulado-infundibuliformes, de 3 cm de diámetro; segmentos exteriores del perianto de color rosa claro, con la línea media de color café; segmentos interiores del perianto casi blancos, con la línea media de color rosa, lanceolados, agudos; estilo rosado; lóbulos del estigma 5, de color amarillo verdoso claro.

Fruto claviforme. **Semillas** de color café claro, algo rojizo, de 1 mm de diámetro, gruesamente foveoladas; hilo basal pequeño. Esta especie se distribuye en el Estado de Coahuila. Localidad tipo: San Pedro, cerca de la laguna de Viesca, donde crece junto con *Ariocarpus kotschoubeyanus* var. *macdowellii* y *Coryphantha borwigii*.

ANEXO 2

MEDIO DE CULTIVO MS (Murashige y Skoog, 1962)

Macronutrientes

	MS	MS 50%
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650	825
KNO ₃	1900	950
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185
KH ₂ PO ₄	170	85
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	220

Micronutrientes

	MS	MS 50%
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
KI	0.83	0.415
H ₃ BO ₃	6.2	3.1
(MnSO ₄ .H ₂ O)	16.89	8.445
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	4.3
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.125
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.0125
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.0125

Sacarosa

MS	MS 50%
mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
3000	1500

Solución Fe-EDTA

	MS	MS 50%
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
Na ₂ EDTA	37.3	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8

Inositol

MS	MS 50%
mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
100	100

Vitaminas

	MS	MS 50%
	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
Ácido nicotínico	0.5	0.5
Piridoxina-HCl (B ₆)	0.5	0.5
Tiamina-HCl (B ₁)	0.1	0.1

Glicina

MS	MS 50%
mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
2.0	2.0

El pH se ajusta antes de la incorporación del agar y, por lo tanto, antes de la esterilización en autoclave, en un rango de 5.7-5.8

Agar bacteriológico Bioxon ® 8 g L⁻¹