



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

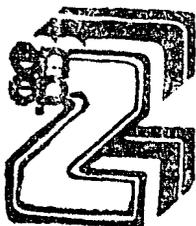
NUEVO MEDIO DE CULTIVO PARA EL RAPIDO
DESARROLLO DE MICOBACTERIAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO

BIOLOGO

P R E S E N T A N
VIRGINIA HERNANDEZ GARCIA
GRACIELA RODRIGUEZ CRUZ





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.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	1
1. GENERALIDADES	3
1.1. Bosquejo Histórico	3
1.2. Características de las Micobacterias	5
a) Clasificación	5
b) Morfología	5
c) Acido Resistencia	7
d) Constituyentes Químicos	9
e) Estructura antigénica	12
1.3. Cultivo	12
a) Requerimientos Nutricionales	18
b) Medios utilizados	21
c) Características de crecimiento	23
1.4. Tipificación de las Micobacterias	25
a) Relación de temperatura	27
b) Producción de pigmento	28
c) Velocidad de desarrollo	29

d) Morfología Colonial	29
e) Procedimiento de Identificación	31
f) Propiedades Enzimáticas	33
2. OBJETIVOS	34
3. HIPOTESIS	35
4. METODOS	36
5. MATERIAL	42
6. EQUIPO	44
7. REACTIVOS	45
8. DESARROLLO EXPERIMENTAL	46
9. RESULTADOS	50
10. CONCLUSIONES	65
11. COMENTARIO	71

	Pág.
APENDICE " A "	72
Procedimientos de laboratorio utilizados.	
APENDICE " B "	85
Pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación de las Micobacterias.	
APENDICE " C "	92
Tablas utilizadas en el Análisis Estadístico.	
BIBLIOGRAFIA	122

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

Desde hace tiempo existe el interés de cultivar las micobacterias en el tiempo más corto posible o al menos en un lapso menor del hasta ahora alcanzado, ya que esto mejoraría importantemente el diagnóstico temprano, el tratamiento y prevención de algunas micobacteriosis.

En la actualidad los cultivos se hacen en medios tradicionales (principalmente en el medio de Löwestein Jensen), en los cuales el tiempo de incubación dura 10 días o más de un mes.

Se han publicado nuevos medios de cultivo y ha habido algunas modificaciones a los actuales, pero aún prevalece lo prolongado del tiempo de incubación y el avance en este sentido es aún esperado.

Este desarrollo tardío de las micobacterias bien pudiera deberse a que aún no se ha encontrado el medio de cultivo ideal y no tanto al llamado metabolismo lento de las micobacterias.

En este trabajo se realizó el estudio de un medio de cultivo cuyo principal fundamento es la aplicación de extracto de espárragos, en sustitución de la

asparagina, en un caldo glicerinado; para promover el desarrollo temprano de las micobacterias, con atención especial a Mycobacterium tuberculosis, ya que este tiene una gran importancia diagnóstica.

1. GENERALIDADES

1.1. Bosquejo histórico.

Las micobacterias incluyen desde saprófitos inocuos del suelo y las aguas, hasta organismos que son responsables de dos enfermedades humanas devastadoras; la tuberculosis y la lepra.

La naturaleza trasmisible de la lepra fue ya admitida en tiempos bíblicos, por esta razón, los leprosos fueron marginados de la sociedad. Mientras que la tuberculosis, aunque más contagiosa, no fue reconocida como enfermedad infecciosa hasta el siglo pasado.

En 1874 Hansen describió el agente etiológico de la lepra, Mycobacterium leprae (3, 14).

En 1882 Koch, descubrió el agente etiológico de la tuberculosis, Mycobacterium tuberculosis, así como también estudió los problemas de la patogénesis y la inmunidad en esta enfermedad (8, 14).

Existen datos para suponer que la tuberculosis existió desde la más remota antigüedad, como lo demuestra el descubrimiento de lesiones en momias de Egipto y la observación de huesos humanos y de animales antiguos

con secuelas que pueden considerarse de origen tuberculoso (2).

Hipócrates (460 - 370 A. C.), la denominó con el nombre de tisis. Galeno (130 - 200), consideró que la tisis era contagiosa al afirmar que las personas que duermen con tísicos largo tiempo contraen la enfermedad. Fracastoro (1483 - 1553), sospechó la existencia de un agente etiológico específico para cada enfermedad, sentando así, las bases de la teoría del contagio.

Laennec (1781 - 1826), pudo identificar como tuberculosis, muchas de sus varias manifestaciones, estableciendo así las bases para un diagnóstico correcto. Willemin (1827 - 1892), demostró la transmisibilidad de la enfermedad mediante la inoculación de material de lesiones tuberculosas de humanos a conejos, en los que reprodujo la enfermedad (2).

1.2. Características de las micobacterias.

a. Clasificación:

Las micobacterias son microorganismos que pertenecen a la familia Mycobacteriaceae, se consideran como formas de transición entre las eubacterias y los actinomicetos; algunos de estos últimos (pertenecientes al género *Norcadia*) son débilmente ácido resistentes; además, algunas micobacterias pueden mostrar ramificaciones. De acuerdo con ésto, las micobacterias se han clasificado en el orden Actinomycetales y clase Schizomycetes. (2, 9, 14, 31).

b. Morfología:

El género Mycobacterium esta constituido por células en forma de bastón (algunos ligeramente curvados), que raramente se ramifican bajo las condiciones ordinarias de cultivo. Son Gram positivos en cultivos jóvenes, no son móviles y son de tamaño variable, generalmente de 2 a 4 micras de largo por 0.3 a 1.5 micras de diámetro (9, 10, 11, 14).

El género está caracterizado por una propiedad única de tinción, la ácido resistencia, la cual es exhibida particularmente por las células. Se encuentran aislados o en grupos pequeños o como masas compactas donde se observan los bacilos individuales (2).

Las células de Mycobacterium tuberculosis tienden a permanecer paralelas unas con otras formando apretados paquetes de cordones, un patrón que se asocia con la presencia de un glucolípido tóxico, factor cuerda (por la virulencia) (2, 9).

En los tejidos suele conservarse la forma bacilar. En cultivos, algunas veces se observan formas filamentosas más largas con células hinchadas o en forma de maza que semejan al bacilo diftérico. En los cultivos de bacilos de la tuberculosis de las aves se encuentran formas ramificadas, pero rara vez en los bacilos de los mamíferos (11).

Las células individuales presentan también una estructura granulosa. Tienen vacuolas en abundancia, que pueden dar a la célula teñida el aspecto de cocos. No se conoce el significado de los cuerpos pequeños, teñidos intensamente, que a veces se observan en el interior de la célula (11).

Las células son procariotes y están limitadas

por una pared rígida. No tienen flagelos, ni pilis, esporas o cápsulas, pero pueden producir una sustancia capsular en cultivos artificiales, sobre todo cuando crecen en medios con suero. Las diferentes especies son identificadas de acuerdo a sus características coloniales, fisiológicas y propiedades bioquímicas.

La estructura antigénica, la susceptibilidad a bacteriófagos, la sensibilidad a drogas y patogenicidad en especies animales, constituyen propiedades adicionales y útiles en la identificación (11).

Se han descubierto formas G "abacilares" (estructuras diminutas) que aparecen, en su mayoría, en condiciones desfavorables (14).

El microscopio electrónico muestra la existencia de una pared gruesa y frecuentemente, de grandes mesosomas laminares. También pueden observarse gránulos de glucógeno y cuerpos de polimetáfosfato (volutina); estos últimos se tiñen metacromáticamente por los colorantes catiónicos (9).

c. Acido resistencia:

Históricamente las características diagnósticas

de las micobacterias es la resistencia a los ácidos, pero esta propiedad no es siempre suficiente para distinguirla de cultivos o cepas de Nocardia y Corynebacteria. Ya que esta característica depende de la edad del cultivo, la composición del medio y el tiempo en que se realizó el aislamiento (6).

La ácido resistencia es una propiedad tintoreal característica de este grupo de bacterias, que consiste en que difícilmente se tiñen con colorantes básicos, pero una vez teñidas retienen el colorante, resistiendo la decoloración con ácidos minerales diluidos en alcohol u otros decolorantes, por lo cual reciben el nombre de bacilos ácido resistentes y se debe, al parecer, a la presencia de ácido micólico (2, 14).

Esta propiedad conocida como ácido resistencia se demuestra en la coloración de Ziehl-Neelsen, de la cual existen varias modificaciones. La ácido resistencia está relacionada a la naturaleza de los complejos lípidos que se encuentran en la célula, en particular la rama de los hidroxiacidos de alto peso molecular, los cuales son conocidos como ácidos micólicos, la ácido resistencia también se relaciona con la integridad física de la célula (11, 46).

Cuando se tiñen por el método de Gram, las micobacterias pueden aparecer como Gram positivas; pero toman el colorante débil e irregularmente y no necesitan el tratamiento con lugol para retenerlo (9).

Cierto número de organismos diferentes de las micobacterias son también ácido resistentes, tales como algunas esporas bacterianas y fúngicas y una sustancia denominada ceroide (que se encuentra en el hígado en ciertos estados de deficiencia nutricional).

Sin embargo, estas sustancias no requieren la presencia de fenol (o anilina) en la solución decolorante. Las nocardias ácido resistentes se tiñen y decoloran más fácilmente que las micobacterias (9).

d. Constituyentes químicos:

El género Mycobacterium difiere de la mayoría de las bacterias en que tienen un contenido especialmente abundante de material graso en su composición, con cantidades que oscilan entre el 20 y 40 % de su peso seco. Por medios químicos se han obtenido de las células bacterianas fosfátidos, ceras y lípidos complejos, a partir de los organismos desecados (9).

La función de estas sustancias no se conoce por completo, pero existen pruebas de que están situadas estratégicamente en las células e influyen en forma destacada sobre el comportamiento de los organismos. Las microfotografías electrónicas muestran que las paredes están compuestas de tres capas que envuelven una membrana citoplasmática, la cual posee también tres capas.

Otros componentes de las paredes celulares son los aminoácidos, polisacáridos y lípidos.

Aproximadamente el 60 % del total de lípidos se encuentran en la pared celular y abundan especialmente las ceras, que incluyen en su composición ácidos micólicos y ceras B, C y D solubles en cloroformo. Las ceras A, solubles en acetona, se localizan principalmente en el citoplasma. Abundan también fosfátidos y lípidos que se extraen de las paredes celulares (5).

Estudios recientes de las fracciones de las ceras de las micobacterias, han dado un conocimiento más preciso de estas estructuras de elevado peso molecular, cadenas unidas en alfa, ácidos grasos beta-hidroxiclicos (ácidos micólicos), que están libres y esterificados con el glicerol, oligosacáridos y polisacáridos, en estos organismos.

Los ácidos micólicos no esterificados son los

únicos lípidos del bacilo tuberculoso, que son ácidos grasos per se.

Un "polisacárido" antigénico ha demostrado contener además de ácido micólico y un polisacárido serológicamente activo, tres aminoácidos, incluyendo ácido diaminopimélico (11).

La sorprendente abundancia de lípidos en la célula bacteriana explica el carácter hidrófobo de los organismos, que se muestra por su tendencia a adherirse a los otros durante el crecimiento en medios acuosos y a flotar en la superficie a pesar de añadir al medio detergentes que facilitan la dispersión. También explica la relativa permeabilidad a los colorantes, la resistencia, la resistencia a la acción letal de los ácidos y de los álcalis y a la acción bactericida de los anticuerpos, junto con el complemento.

La enorme cantidad de lípidos encontrados o sintetizados puede contribuir a la lentitud de crecimiento, tanto al dificultar el paso de las sustancias nutritivas al interior de la célula, como al consumir gran parte de la capacidad biosintética de ésta (9, 25).

e. Estructura antigénica:

- Proteínas. Las proteínas de los bacilos ácido resistentes ponen de manifiesto la alergia o hipersensibilidad retardada que se presenta en la infección tuberculosa, las proteínas son el principio activo de las tuberculinas. La mayoría de las proteínas somáticas son de baja capacidad alergizante, pero cuando se mezclan con fracciones lípidas del mismo Mycobacterium o con aceites naturales pueden inducir con más facilidad la sensibilidad a la tuberculina.

Las proteínas ribosomales son capaces no sólo de poner de manifiesto la hipersensibilidad sino también de inducirla incluso con mayor facilidad que las proteínas protoplasmáticas.

En enfermos tuberculosos se pueden demostrar anticuerpos antiproteínas, sin que sean de tipo protector (2, 25).

- Polisacáridos. No se ha demostrado que los polisacáridos de Mycobacterium sean capaces de poner de manifiesto la alergia (2).

- Lípidos. Son probablemente responsables de la mayo-

ría de las reacciones de los tejidos al bacilo tuberculoso, se sabe que las fracciones fosfátidos son capaces de producir respuestas tisulares que semejan tubérculos que pueden conducir inclusive a necrosis caseosa (2, 23).

1.3. Cultivo.

Se considera especialmente al cultivo de Mycobacterium tuberculosis en la muestra de esputo, aún cuando en gran parte lo que se refiere a este microorganismo es aplicable a otras micobacterias.

El cultivo es el método bacteriológico de rutina más sensible y específico de los que se conocen en la actualidad, para descubrir M. tuberculosis en una muestra determinada. Es un complemento de la baciloscopía, que tiene gran importancia sobre todo cuando las acciones de lucha antituberculosa han permitido situar el diagnóstico no en los casos avanzados, intensamente bacilíferos, sino en aquellos más recientes con eliminación bacilar discreta. Pero aunque el cultivo permite diagnosticar un número mayor de casos de tuberculosis, su elevado costo obliga a orientar convenientemente su empleo.

Mycobacterium tuberculosis es un microorganismo exigente que necesita medios enriquecidos o especiales.

Un medio de cultivo ideal para ser usado como estándar debe tener las siguientes características:

1. Que sea de una sensibilidad tal que permita el crecimiento de M. tuberculosis a partir de muestras que lo contienen en escasa proporción.
2. Que dé nacimiento a colonias con características morfológicas específicas.
3. Que el crecimiento de las colonias sea rápido.
4. Que inhiba el desarrollo de microorganismos contaminantes.
5. Que no se contamine fácilmente durante su preparación.
6. Que sea fácil de preparar y de costo reducido.
7. Que sea utilizable para hacer los estudios de resistencia y la prueba de la niacina.
8. Que sea fácil de manipular en el traslado de un laboratorio a otro.

Uno de los factores que diferencia un medio de cultivo de otro es su mayor o menor riqueza en elementos nutritivos (18).

Los medios sintéticos más sencillos, como el de Sauton o el de Long sólo contienen minerales (citrato ferroso, fosfato potásico), asparagina y glicerol; son aptos para el desarrollo de micobacterias que están habituadas a los medios artificiales, pero no lo son para el cultivo de microorganismos que provienen de ambientes naturales como órganos y tejidos (14, 18).

Medios más ricos como el de Löwestein Jensen, el 7H10 y otros, que además de lo anterior contienen materias orgánicas como huevo, suero y aún enzimas, son aptos para el diagnóstico bacteriológico porque permiten el crecimiento hasta de muy pequeño número de micobacterias sembradas (18).

Existen otros medios de cultivo que contienen productos especiales con el objeto de desarrollar cierto tipo de micobacterias, como el de Stonebrink con piruvato de sodio muy útil para el primocultivo de Mycobacterium bovis (18, 43).

Entre los medios que se utilizan para el diagnóstico se encuentran los líquidos y los sólidos. Los líquidos, como el de Sula y 7H9 son con frecuencia usados para hacer subcultivos de las cepas de colección, o para preparar el inóculo para las pruebas de resistencia;

los que contienen tween 80* son muy útiles para obtener el desarrollo disperso de las micobacterias. Ciertas cepas resistentes a varios medicamentos a la vez se desarrollan mejor en los medios líquidos, pero en general estos medios no son muy empleados en el diagnóstico de rutina. En los medios líquidos un microorganismo contaminante generalmente enturbiará todo el medio, en los sólidos en cambio, pueden quedar áreas libres para que pueda crecer Mycobacterium tuberculosis.

Aunque este tipo de medios se ha usado para el estudio de resistencia a fármacos, hoy se tiende cada vez más a emplear el medio sólido. El procedimiento de preparación de los medios líquidos es difícil, porque debe hacerse en un ambiente perfectamente estéril.

Por las razones expuestas, la utilización de un medio líquido como procedimiento de rutina para el aislamiento de Mycobacterium tuberculosis, a partir de muestras de esputo, no es recomendable para los países Latinoamericanos.

Aunque en los medios sólidos tampoco hay uno que reúna las condiciones ideales (mencionadas anteriormente), el de Löwestein Jensen es el que más se acerca a

* marca registrada.

ellas. Es el más empleado en el mundo y se adapta mejor que cualquier otro a las posibilidades de los países en vías de desarrollo. Sus principales características son:

1. Es un medio sólido, a base de huevo, fácil de preparar, especialmente la fórmula de la Unión Internacional contra la Tuberculosis, que ha suprimido la harina de papa sin menoscabo de su sensibilidad.
2. Las colonias de Mycobacterium tuberculosis se desarrollan con un aspecto característico y se destacan fácilmente sobre la superficie del medio.
3. Tiene buena sensibilidad.
4. Permite el desarrollo de una amplia variedad de micobacterias.
5. Las colonias crecen entre 15 y 60 días después de la inoculación.
6. El porcentaje normal de contaminación de los tubos es bajo.
7. Sobre las colonias desarrolladas en él se puede hacer la prueba de la niacina.
8. Es el medio que se utiliza para el estudio

de resistencia por el método de las proporciones.

9. Se contamina difícilmente al prepararlo porque se coagula después de entubado.
10. Puede ser almacenado por algunos meses antes de su uso.
11. Por ser un medio sólido, una vez preparado a nivel central, puede ser enviado sin dificultad de transporte, a laboratorios regionales y por el mismo motivo los cultivos ya desarrollados pueden ser enviados al laboratorio central para su tipificación o estudio de resistencia.
12. Es utilizado como medio de rutina en la mayoría de los países de América Latina.

Otro medio sólido de excelente calidad es el 7H10 de Middlebrook y Cohn, que contiene ácido oleico, albúmina y catalasa, pero que por la complejidad de su preparación y por su alto costo no se adapta a las condiciones de América Latina (18).

a. Requerimientos nutricionales:

Las micobacterias son aerobios estrictos. Utilizan para crecer una multiplicidad de compuestos orgánicos simples como fuente de energía y amoníaco o aminoácidos como fuente de nitrógeno. No existen evidencias de que requieran factores esenciales de crecimiento (vitaminas), excepto biotina, bajo ciertas circunstancias, o micobactina que es requerida por Mycobacterium paratuberculosis (1, 2, 4, 5, 9, 11, 14, 18).

Necesitan bióxido de carbono para la iniciación de su crecimiento, algunas cepas requieren para su crecimiento óptimo concentraciones elevadas que están disponibles en el aire (11,40).

El cultivo de micobacterias desarrolla más rápidamente en Tween a un pH de 6.0 a 8.0, con un rango óptimo de 6.5 a 6.8 para los tipos patógenos. Las micobacterias muestran una amplia variación en cuanto a su temperatura ideal de crecimiento, pero las cepas patógenas para animales de sangre caliente, con dos excepciones importantes (M. ulcerans y M. balnei), se multiplican más rápidamente en Tween a 35 y 40°C, M. avium es especialmente tolerante a altas temperaturas, de acuerdo a la elevada temperatura corporal de sus hospederos naturales (11).

El crecimiento de muchas micobacterias es lento comparado con el de las bacterias comunes, forman cordones en el caso de los tipos humano, bovino y murino (9, 11, 35).

El crecimiento del bacilo tuberculoso es lento en primocultivo, tarda en crecer entre dos y cuatro semanas. Las cepas de laboratorio, es decir áquellas que ya han sido resemebradas y cultivadas varias veces, crecen con un poco de mayor rapidez y de manera abundante. Algunas otras micobacterias, sobre todo las saprófitas, pueden presentar crecimiento en dos o tres días (1, 18).

- Fuentes de carbono. La fuente de carbono más importante para el desarrollo satisfactorio de la mayoría de las micobacterias es el glicerol. Otras fuentes de carbono (glucosa, fructuosa, acetato, piruvato, citrato o propanol), pueden ser utilizadas por algunas micobacterias. En muy pocas especies se ha observado la utilización de sacarosa, succinato, malonato, fumarato y butanol (2, 9, 11).

Cuando las micobacterias utilizan el glicerol, como fuente de carbono, se observa un incremento en la producción de lípidos y materiales de reserva como el glucógeno y aumenta el peso seco de la célula (6, 9).

- Fuentes de nitrógeno. Para el desarrollo de las micobacterias existen varias fuentes de nitrógeno, algunas pueden utilizar nitrato o nitrito como única fuente, la mayoría utilizan sales de amonio; sin embargo, la velocidad de desarrollo puede incrementarse utilizando aminoácidos o amidas como fuente de nitrógeno.

En particular, la asparagina, glutamato y aspartato son buenos estimuladores del desarrollo. La asparagina se prefiere ampliamente, sus átomos de nitrógeno del grupo amino y amido son incorporados a los constituyentes celulares, así como sus átomos de carbono.

- Elementos inorgánicos. Las micobacterias, para su desarrollo requieren de elementos inorgánicos mayores como: potasio, fósforo (PO_4^{-3} ó PO_3^{-2}), magnesio, azufre (SO_4^{-2}).

Las necesidades de elementos menores o trazas de éstos, por las micobacterias, son probablemente idénticas a las otras bacterias, pero no todas ellas emplean la misma cantidad de un metal en particular. La proporción de estos compuestos inorgánicos que se tienen que adicionar al medio de cultivo, depende de las impurezas que el mismo medio contenga como contaminantes. Los iones inorgánicos indispensables para el desarrollo de las micobacterias son: fierro, zinc, así como trazas de:

Al^{+3} , Ag^{+1} , BO_3^{+3} , Co^{+2} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , Pb^{+2} y VO_3^{-1} (6,22,28).

b. Medios utilizados:

- Löwestein Jensen. Este medio es recomendado para el trabajo sistemático, es simple de preparar y puede ser empleado para el cultivo primario, identificación y pruebas de sensibilidad de micobacterias.

- Agar de Middlebrook y Cohn 7H10. Es un medio con una fórmula mejorada del agar de ácido oleico albúmina. Se utiliza para el aislamiento y pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos por las micobacterias, favoreciendo el desarrollo temprano de los bacilos tuberculosos típicos.

- Agar inclinado 7H11. Este medio es el agar 7H10 de Middlebrook y Cohn, modificado por la adición de un gramo de hidrolizado enzimático de caseína por litro.

Se emplea para el cultivo y pruebas de sensibilidad de micobacterias, especialmente de aquellas que desarrollan en el agar 7H10 y en otros medios comunes de aislamiento.

- Caldo de Middlebrook 7H9. Este caldo está enriquecido con albúmina y dextrosa. Se utiliza en procedimientos que requieren el desarrollo de micobacterias.

- Medio de Petragnani. Es un medio glicerinado de huevo y papa, elaborado con una base de leche y verde de malaquita en una concentración de 0.045 %. Es algo más inhibitorio que el medio de Löwestein Jensen, debido a su contenido más elevado de colorante. Este medio se recomienda para especímenes viejos y para usarse paralelamente con otros medios para aislamiento de bacilos tuberculosos.

- Medio de Petroff. Es un medio glicerinado de huevo coagulado con una base de infusión de res, que contiene cristal violeta como agente inhibidor selectivo.

- Agar inclinado de Mycobactosel. Es el agar 7H11 más cicloheximida, lincomicina y ácido nalidíxico, para la inhibición de microorganismos contaminantes y para permitir la obtención de resultados negativos y positivos más confiables, en el aislamiento de especímenes de flora mixta.

- Agar con ácido oleico de Dubos. Esta base se emplea para la preparación de varios medios traslúcidos incluyendo el agar con ácido oleico y el agar con Tween y albúmina, que son especialmente útiles para el estudio de la morfología y disociación de las colonias, así como para el recuento bacteriano por el número de colonias.

También se puede emplear en la preparación de cultivos masivos de cepas que se mantienen siempre en existencia en el laboratorio, en las pruebas de sensibilidad y en el aislamiento de los bacilos tuberculosos (1, 6).

Para algunos propósitos, no es necesario añadir enriquecimiento, puede emplearse suero, Tween, o ambos (22, 27, 28)

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

c. Características de crecimiento:

El medio preferido y más empleado es el de Löwestein Jensen. En este medio, los bacilos de la tuberculosis dan lugar, por lo general, a colonias rugosas,

de color paja, secas, irregulares, conglomeradas, semejantes a migajas de pan, duras y resistentes, no pigmentadas y se adhieren fuertemente al medio; Mycobacterium tuberculosis crece mejor que Mycobacterium bovis en este medio, por esa razón se denomina como crecimiento "eugónico" el del primero y "disgónico" el del segundo (2, 9).

En medios líquidos, el bacilo de la tuberculosis crece en la superficie formando una película corrugada con gotas de grasa en la parte superior. Las cepas vivas y virulentas de M. tuberculosis forman cordones. La cera C, soluble en cloroformo, es la responsable del modelo de cultivo en forma de cordón. Este factor cordón contiene un lípido tóxico y parece ser uno de los materiales importantes, responsables del poder patógeno, debido a que se ha aislado constantemente de las cepas virulentas (2, 5, 9, 14).

Existen otras micobacterias, denominadas atípicas, las cuales se caracterizan por la pigmentación que producen y su velocidad de crecimiento (4, 7, 30, 32).

1.4 Tipificación de las micobacterias.

Una vez aisladas las micobacterias en cultivos puros, pueden ser agrupadas de acuerdo al tiempo y temperatura de incubación requeridos para obtener crecimiento visible, así como tipo de colonias y pigmentación.

Inicialmente, estas observaciones pueden hacerse en el aislamiento primario, puesto que los cultivos son observados a intervalos semanales.

La pureza del cultivo deberá ser impuesta y establecida sembrando una muestra de cultivo para obtener colonias aisladas. Esta pureza significa ausencia de un cultivo mezclado de micobacterias.

Aún cuando Mycobacterium tuberculosis es la especie de primordial importancia en Micobacteriología Médica y en salud pública, su presencia en un cultivo, puede inferirse del tiempo de incubación requerido para obtener desarrollo visible, se debe comprobar la apariencia de las colonias y la demostración de niacina en los extractos de los cultivos, para llegar a un diagnóstico.

Las colonias aisladas de cada tipo, deben ser transferidas de preferencia a un medio líquido y ser estudiadas separadamente. Los cultivos así obtenidos, se siembran en una gran variedad de medios, para determi-

nar su velocidad de desarrollo, producción de pigmento y otras propiedades necesarias para su identificación.

Runyon basándose en la velocidad de desarrollo y formación de pigmentos, dividió a las micobacterias usualmente aisladas en el laboratorio clínico (excepto M. bovis, M. tuberculosis, M. avium y M. marinum), en cuatro grupos hasta ahora referidos como "atípicos" o "no clasificados".

Aquellas micobacterias que no se pueden clasificar con los métodos comunes deberán ser agrupadas según Runyon:

CLASIFICACION DE RUNYON

I. Fotocromógenas.

De crecimiento lento, colonias no pigmentadas cuando se desarrollan en la obscuridad; tienen un amarillo brillante cuando las colonias jóvenes se exponen a la luz.

II. Escotocromógenas.

De crecimiento lento, las colonias son amarillas

o anaranjadas, aún si se desarrollan en la obscuridad.

III. No fotocromógenas.

De crecimiento lento, colonias generalmente sin pigmentación.

IV. De rápido crecimiento.

Se desarrollan a los 7 días o menos.

a. Relación de temperatura:

Basándose en la temperatura a la cual las bacterias crecen mejor, pueden ser clasificadas como termófilas (desarrollan mejor a 40 °C o más), mesófilas (de 20 a 37 °C), y psicrófilas (crecen mejor a 20 °C o menos). Todas las micobacterias, por lo menos aquellas aisladas del hombre y otros animales, son mesófilas. Aún cuando la temperatura de incubación sobre el aislamiento primario puede ser alta (*M. avium* y *M. xenopi*) o relativamente baja (*M. marinum* y *M. ulcerans*). Con la posible excepción, todas las micobacterias crecen bien a 35 y 36 °C en subcul-

tivos de laboratorio (18).

b. Producción de pigmento:

Las micobacterias sintetizan pigmentos carotenoides que son muy notables en algunas especies.

Algunas micobacterias los sintetizan, únicamente después de que los cultivos jóvenes son expuestos a la luz, éstas se denominan micobacterias fotocromógenas; en otras, las escotocromógenas, el pigmento es sintetizado ya sea que los cultivos sean incubados en la obscuridad o en la luz; finalmente un tercer grupo no sintetiza pigmento en cantidad y son llamadas no cromógenas (6).

Estudiando las condiciones para la producción de pigmento, en el laboratorio de diagnóstico, los cultivos se preparan por duplicado y uno es incubado, tapado de la luz visible. Cuando aparecen colonias en el cultivo sin tapar, se quita la cubierta del otro cultivo y se anota la presencia de pigmentos. Si no se observan pigmentos, las colonias se exponen a la luz por una hora, y el cultivo después se incuba tapado durante la noche. La producción de pigmento después de exposición a la luz indica que el cultivo es una especie de micobacteria fotocromógena. Al determinar la producción de pigmento,

la sobre incubación puede dar resultados erróneos. Además, la producción de pigmento, tanto en los escotocromógenos como en los fotocromógenos, requiere de libre acceso de aire y solamente los cultivos jóvenes de las fotocromógenas producen pigmento (18).

c. Velocidad de desarrollo:

La velocidad de desarrollo, se determina sembrando la superficie de un medio sólido adecuado, con un pequeño inóculo, para obtener colonias aisladas. Los cultivos son incubados y leídos de los 5 a 7 días después de sembrados, después de este período, cada semana. Las micobacterias de crecimiento rápido, dan colonias visibles en 7 días (o menos) de incubación; aquellas que dan colonias en 7 días o más son conocidas como de crecimiento lento (18).

d. Morfología colonial:

Las micobacterias forman una gran variedad de tipos de colonias sobre medios sólidos, la morfología colonial puede cambiar con el medio, pero es marcadamente estable en un medio determinado. Como ya se dijo, los

medios sólidos son los preferidos para el primocultivo.

Se ha demostrado una íntima relación entre la morfología colonial y el contenido de ácidos micólicos de las células.

Fregman y Smith propusieron una clasificación sistemática de los tipos de las colonias y enfatizaron la importancias del medio escogido. Usaron las palabras "lisa" y "rugosa" seguida por símbolos para describir los tipos coloniales (14).

Sobre todos los medios, M. tuberculosis forma colonias secas, rugosas y duras, distintas a las colonias rugosas formadas por otras especies (1, 2, 4, 9, 45).

Lorian demostró que los cordones observados en las colonias jóvenes de M. tuberculosis, podían ser mejorados agregando el agente tensoactivo triton* WR/1339 al medio 7H10 (1, 36).

Las colonias de M. xenopi son muy distintas; algunas pueden estar parcial o completamente cubiertas por cortas estructuras parecidas a hifas. Las colonias con hifas aéreas son rugosas; las colonias lisas muy rara vez presentan hifas aéreas, son húmedas y transparentes. M. bovis. forma colonias pequeñas, traslúcidas,

* marca registrada.

incoloras y de forma piramidal sobre medio de huevo. Estos ejemplos muestran la enorme variedad de aspectos que se deben estudiar y lo útil que es el reconocimiento de los tipo coloniales en la identificación. Por otro lado, el poder reconocer los diversos tipos coloniales es indispensable para saber si hay contaminación o mezcla de cultivos (1, 11, 36).

e. Procedimiento de identificación:

Se hace un frotis del desarrollo obtenido y se tiñe para determinar si las colonias están compuestas de bacilos ácido resistentes. Esto es importante porque organismos contaminantes pueden interferir con los resultados de las pruebas de identificación.

Se deben separar los cultivos de acuerdo a su velocidad de crecimiento y formación de pigmentos.

Cuando hay duda acerca de la velocidad de desarrollo o de su cromogenicidad, se deberá hacer un subcultivo con un pequeño inóculo para obtener colonias aisladas.

Seleccionar las pruebas de identificación necesarias de acuerdo al nivel de servicio ofrecido por el laboratorio, nunca confiar en una sola prueba para identificar las especies de micobacterias (10, 18, 24, 39).

Pruebas a seguir:

CULTIVO:

INOCULAR:

Micobacterias de crecimiento rápido.

A medio de Dubos o caldo de Tween albúmina, Arilsulfatasa, MacConkey Tolerancia al NaCl, Nitratos.

Micobacterias de crecimiento lento (no cromógenas y cromógenas).

A medio de Dubos o Caldo de Tween albúmina, Hidrólisis del Tween, Tolerancia al NaCl, Arilsulfatasa Ureasa, una hora a la luz, Catalasa, Nitratos.

Micobacterias de crecimiento lento (pruebas adicionales).

Reducción de telurito, Pirazinamida, Catalasa (pH=7 a 68°C), Niacina.

M. bovis (sospechoso)

Hidracida del ácido carboxílico, Tiofen 2, Pirazinamida, Inoculación al conejo.

f. Propiedades enzimáticas:

En los bacilos tuberculosos se ha demostrado la presencia de enzimas proteolíticas que desintegran las proteínas tanto en medio alcalino como ácido; fermentan carbohidratos, glicerina, lecitina, fosfátidos y urea. Se caracterizan por su poder reductor, desintegran los aceites de oliva y de ricino.

Los fosfátidos facilitan la transformación de los monocitos en células epiteloides y en fibroblastos y la mitosis atípica de ciertos elementos tisulares (14).

2. O B J E T I V O S

2.1 Obtener un medio de cultivo de fácil preparación y bajo costo; en el cual las micobacterias desarrollen en un tiempo menor al alcanzado hasta ahora en los medios tradicionales.

2.1.1 Determinar las relaciones existentes entre medio de cultivo, tiempo de crecimiento, tipo de crecimiento, baciloscopía y pH.

2.1.2 Este medio de cultivo mejorará importantemente el diagnóstico temprano, tratamiento y prevención de las micobacteriosis.

3. HIPOTESIS

Las micobacterias se desarrollan en medios clásicos bien definidos. Si se hacen variar algunos de los factores nutricionales presentes en estos medios, se pueden obtener crecimientos en periodos de tiempo menores, que en los medios tradicionales.

4. METODOS

4.1. En relación con el medio de cultivo:

a. Preparación del medio de cultivo de acuerdo a las siguientes especificaciones:

Fórmula:

Extracto de carne	3.0 g.
Peptona	5.0 g.
Cloruro de sodio	8.0 g.
Glicerina	60.0 ml.
Extracto de espárragos	160.0 ml.
Agua destilada, llevar a volumen final de:	800.0 ml.

Se debe ajustar el pH a las necesidades del cultivo.

b. Preparación del extracto de espárragos:

Se utilizan espárragos industrializados blancos y naturales verdes y blancos. La composición y marca de los espárragos se menciona a continuación:

Del Monte*: Espárragos blancos, agua y sal yodatada.

Poma Rosa*: Espárragos blancos, agua, sal yodatada y ácido cítrico.

Ann O'Brien*: Espárragos blancos, agua, sal yodatada, ácido cítrico y ácido ascórbico.

El contenido proteico y de aminoácidos en los espárragos naturales es el siguiente (19):

De la parte comestible:	g/100g
Nitrógeno	92.9
Proteínas	2.1
Isoleucina	0.055
Leucina	0.096
Lisina	0.096
Metionina	0.028
Cistina	0.019
Contenido de S-aminoácidos	0.047
Fenilalanina	0.055
Tirosina	0.044

* Marca registrada.

	g/100g
Total de aminoácidos aromáticos	0.099
Treonina	0.060
Valina	0.079
Arginina	0.083
Histidina	0.034
Alanina	0.121
Acido aspártico	0.230
Acido glutámico	0.442
Glicina	0.072
Prolina	0.121
Serina	0.068
Total de aminoácidos esenciales	0.557
Total de aminoácidos	5.067

Para obtener el extracto a partir de espárragos comerciales, se separan los espárragos del agua de imbibición, se exprimen en una gasa (para que liberen y arrastren el contenido de los mismos). El líquido obtenido se filtra a través de un algodón, este filtrado es lo que se utiliza como extracto.

La obtención del extracto a partir de espárragos naturales es la siguiente: Se seleccionan las mejores partes de los espárragos y se lavan con suficiente agua corriente; se introducen en una olla de presión a 15 libras (121 °C) por 15 minutos, se sacan y se sigue un procedimiento análogo al anterior.

c. Preparación del medio de cultivo sólido.

Se prepara adicionando a la fórmula general agar agar (3 %).

d. Preparación del medio de cultivo a diferentes valores de pH.

El pH se ajusta con NaOH al 4 %, hasta alcanzar el pH deseado (7.0, 7.2, 7.4).

4.2. En relación con los microorganismos:

a. Cultivo de cepas puras y muestras (de pacientes con signos y síntomas de tuberculosis), en el medio en estudio.

b. Observación de los desarrollos cada 24 horas.

c. Fotografías de los desarrollos obtenidos.

d. Frotis de los cultivos obtenidos, teñidos por las técnicas de Ziehl Neelsen y Gram (Apéndice "A"), para determinar:

- tipo y forma.
- ácido resistencia.
- reacción a la tinción de Gram.
- posibles contaminaciones.

e. Pruebas de identificación (Apéndice "B").

- niacina.
- catalasa.
- arilsulfatasa.
- reducción de nitratos.
- hidrólisis de tween.
- reducción de telurito.

f. Cultivos cruzados.

- Siembra simultánea de las cepas y material biológico en el medio en estudio y en el medio tradicional de

Löwestein Jensen.

- Inoculación del medio en estudio con cultivos desarrollados en el medio tradicional.

- Inoculación del medio tradicional con cultivos desarrollados en el medio en estudio.

4.3. Análisis estadístico de los resultados, para determinar la relación existente entre las variables manejadas (Apéndice "C").

5. MATERIAL

5.1. Material de laboratorio:

- Tubos de ensayo con tapón de rosca.
- Matraces Erlenmeyer de 125 y 250 ml.
- Vasos de precipitados.
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Embudos de talle corto y largo.
- Probetas de 50, 100 y 500 ml.
- Jeringas desechables de 1 ml.
- Vidrios de reloj.
- Asas bacteriológicas.
- Algodón.
- Gradillas de alambre.
- Marcadores.
- Guantes desechables.
- Cámara y puentes para tinción.
- Gradillas de madera para frotis.
- Frascos gotero.
- Portaobjetos.
- Mecheros.

5.2. Material biológico.

- Cepas tipificadas del Laboratorio de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I. P. N. (Enviadas de Mycobacterial Culture Collection, 1972. Trudeau Institute Inc.).

- Expectoraciones positivas y negativas, así como muestras de orina y líquido cefalorraquídeo del Laboratorio Central del Diagnóstico de Tuberculosis y Enfermedades del Aparato Respiratorio, S. S. A.

- Nódulos de enfermo de lepra del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao Pascua", S. S. A.

Otros medios de cultivo utilizados:

- Medios de cultivo (Löwenstein Jensen) del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U. N. A. M.

- Medios de cultivo (Löwenstein Jensen) del Laboratorio Central de Diagnóstico de Tuberculosis y Enfermedades del Aparato Respiratorio de la S. S. A.

6. E Q U I P O

Nombre:	Marca y modelo:
- Balanza analítica	Mettler
- Olla de presión	E. K. C. O.
- Autoclave	AMSCO
- Centrífuga	IEC International Centrifuge; - Model K, size 2.
- Centrífuga	BHG Ideal; Modelo BHG 700
- Vortex	Arthur M. Thomas Co.; 8929-W
- Incubadora	Precision Circulating System-253
- Incubadora	Kinet Pat. 5384 pend.
- Incubadora	Precision Thelco; model 6, temp range to 60°C
- Microscopio	Zeiss West Germany
- Microscopio	Leitz Wetzlar; Mod. SM-LUX
- Refrigerador	Nieto; modelo comercial, 6 puer- tas
- Refrigerador	Westinghouse; modelo W
- Campana bacteriológica equipada con luz <u>ultra</u> violeta	
- Baños María	Precision Scientific Co.; Mod - 66648 MAPSA, Mod. Bl-40-T

7. REACTIVOS

Nombre:	Marca:
- Extracto de carne	Bowril
- Peptona	Difco
- Cloruro de sodio	Monterrey
- Glicerina	Merck
- Extracto de espárragos	Poma Rosa*, Del Monte*, Ann O'Brien*, Naturales
- Cristal violeta	Laitz, S. A.
- Etanol	Laitz, S. A.
- Oxalato de amonio	Laitz, S. A.
- Yodo	Laitz, S. A.
- Yoduro de potasio	Laitz, S. A.
- Acetona	Laitz, S. A.
- Safranina O	Laitz, S. A.
- Fucsina básica	Laitz, S. A.
- Azul de metileno	Laitz, S. A.
- Acido clorhídrico	'Baker Analyzed' Reactivo
- Hidróxido de sodio	'Baker Analyzed' Reactivo
- Acido fénico	'Baker Analyzed' Reactivo
- Rojo de fenol	Técnica Química, S. A.

* Marca Registrada.

8. DESARROLLO EXPERIMENTAL

I. Realización de cultivos en los que se emplearon suspensiones bacilares de diferentes micobacterias.

Los nombres de las micobacterias y los medios de cultivo se mencionan a continuación:

Suspensiones bacilares:

Mycobacterium xenopi.

Mycobacterium marinum.

Mycobacterium phlei.

Mycobacterium kansasii.

Mycobacterium tuberculosis H37Rv

Mycobacterium avium.

Mycobacterium nonchromogenicum.

Mycobacterium microti.

Mycobacterium smegmatis.

Medios de cultivo:

Medio sólido y líquido de espárragos naturales - verdes, a pH 7.0 y 7.2

Medio sólido y líquido de espárragos Ann O'Brien a pH 7.0 y 7.2

Medio de cultivo Löwenstein Jensen.

El procedimiento para la siembra es el siguiente:

- 1) Inocular con jeringa estéril 0.1 ml de suspensión bacilar en cada uno de los medios de cultivo.
- 2) Incubar a 37°C.
- 3) Leer los resultados cada 24 horas.

Cuando ya existe un desarrollo apreciable, realizar frotis de los crecimientos, teñirlos por las técnicas de Zielh Neelsen y Gram (Apéndice " A ") y hacer las observaciones microscópicas.

Hacer pruebas de tipificación a los cultivos obtenidos (Apéndice " B ").

II. Cultivos de muestras biológicas de pacientes que presentan signos y síntomas de tuberculosis. Las muestras trabajadas (expectoración, orina y líquido cefalorraquídeo) se inoculan en los siguientes medios de cultivo.

Medio sólido y líquido de espárragos Ann O'Brien*, Del Monte*, Poma Rosa* y naturales (verdes y blancos). Y medio de Löwestein Jensen.

Procesamiento de la muestra (Apéndice "A"):

- Frotis.
- Tinción.
- Homogenización, decontaminación y neutralización.
- Siembra.
- Incubación a 37 °C.

Cuando ya existen desarrollos apreciables:

- Realización de frotis.

* Marca registrada.

- Teñir por las técnicas de Ziehl Neelsen y Gram.
- Observar microscópicamente.
- Tipificar.

III. Cultivos de Mycobacterium leprae.

Los cultivos se realizan con bacilos obtenidos a partir de homogenizados de nódulos de leproso; estos bacilos se inoculan en el medio de Löwestein Jensen y en el medio de espárragos Ann O'Brien a pH=7.4.

9. RESULTADOS

I. Resultados obtenidos de los cultivos realizados con -- suspensiones bacilares (cepas puras).

a. Comparación de los medios de cultivo en estudio con respecto al medio de Löwestein Jensen.

a.1 Análisis general de las cepas:

Número total de cepas 9

a.2 Comparación del crecimiento en los diferentes - medios.

Número de cepas positivas en Löwestein Jensen y positivas en:

MEDIO DE CULTIVO	pH	
	7.0	7.2
Natural sólido	7	7
Natural líquido	7	7
Ann O'Brien sólido	4	5
Ann O'Brien líquido	6	7

Número de cepas positivas en Löwestein Jensen
y negativas en:

MEDIO DE CULTIVO	pH	
	7.0	7.2
Natural sólido	2	2
Natural líquido	2	2
Ann O'Brien sólido	3	4
Ann O'Brien líquido	3	2

a.3. Comparación de la contaminación:

Número de tubos contaminados :

MEDIO DE CULTIVO	pH			
	7.0		7.2	
	#	%	#	%
Natural sólido	0	0	0	0
Natural líquido	0	0	0	0
Ann O'Brien sólido	1	20	1	20
Ann O'Brien líquido	0	0	0	0

El medio de Löwestein Jensen no presentó
contaminación.

LA SIGUIENTE TABLA MUESTRA EL TIEMPO DE CRECIMIENTO* EN DIAS SOBRE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO; ASI COMO LA REACCION A LAS TINCCIONES** DE ZIEHL-NEESEN Y GRAM DE LAS MICOBACTERIAS ESTUDIADAS.

	S O L I D O S								MEDIOS DE CULTIVO				L I Q U I D O S		CLASICO	OBSERVACIONES
	ESPARRAGO COMERCIAL				ESPARRAGO NATURAL				ESPARRAGO COMERCIAL		ESPARRAGO NATURAL		LOWESTEIN	JENSEN		
	pH = 7.0	pH = 7.2	pH = 7.0	pH = 7.2	pH = 7.0	pH = 7.2	pH = 7.0	pH = 7.2	pH = 7.0	pH = 7.2						
<u>M. xenopi</u>	01 Z (-) G (-)	01 Z (-) G (-)	01 Z (-) G (-)	01 Z (-) G (-)					01 Z (-) G (-)							
<u>M. marinum</u>														15 Z (+) G (+)	No desarrolló en el medio en estudio.	
<u>M. phlei</u>	04 Z (+) G (+)	03 Z (+) G (+)	04 Z (+) G (+)	03 Z (+) G (+)					03 Z (+) G (-)	04 Z (+) G (+)	03 Z (-) G (+)	03 Z (+) G (+)	03 Z (+) G (+)	03 Z (+) G (+)	En el medio de estudio sólido hubo producción de pigmento?	
<u>M. avium</u>	CONTAMIN.	28 Z (+) G (+)	21 Z (+) G (+)	28 Z (+) G (+)					28 Z (-) G (-)	28 Z (-) G (-)	28 Z (+) G (+)	28 Z (+) G (-)	04 Z (+) G (+)			
<u>M. tuberculosis</u> H37 Rv														21 Z (+) G (-)	No desarrollo en el medio en estudio.	
<u>M. nonchromogenicum</u>	NO CRECIO	15 Z (-) G (-)	15 Z (+) G (+)	15 Z (+) G (+)					21 Z (+) G (+)	22 Z (+) G (+)	22 Z (+) G (+)	21 Z (+) G (+)	03 Z (+) G (+)			
<u>M. smegmatis</u>	01 Z (+) G (+)	01 Z (+) G (+)	01 Z (-) G (+)	01 Z (+) G (+)					01 Z (+) G (+)							
<u>M. microti</u>	15 Z (+) G (+)	CONTAMIN.	10 Z (-) G (+)	07 Z (+) G (+)					NO CRECIO	10 Z (-) G (-)	15 Z (-) G (+)	15 Z (+) G (+)	04 Z (+) G (-)			
<u>M. kansasii</u>	15 Z (+) G (+)	NO CRECIO	15 Z (-) G (+)	10 Z (-) G (-)					01 Z (+) G (+)	02 Z (+) G (+)	04 Z (+) G (-)	04 Z (+) G (+)	04 Z (+) G (-)		Presentan pigmento naranja.	

* El tiempo de crecimiento es el número que se da en la parte superior de cada recuadro.
 ** Con respecto a las tinciones, los espacios en blanco indican que no se observaron bacilos (a pesar de haber desarrollado). La "Z" se refiere a la reacción, positiva o negativa, a la tinción de Ziehl Neelsen, de la misma manera la "G" se refiere a la tinción de Gram.

*. Pigmento naranja a los 7 días de incubación.

b. Análisis estadístico de los resultados.

El análisis estadístico se llevó a cabo integrando tablas de contingencia, para determinar las relaciones de dependencia o independencia entre las diversas variables manejadas en este estudio. Se utilizó como estadística de prueba la variable aleatoria Ji-cuadrada (χ^2). Este análisis se llevó a cabo en computadora "Burroughs large Systems".

b.1 Cepa estudiada por tiempo de crecimiento.

$$\chi^2 = 269.9953$$

Grados de libertad = 80

Significancia (∞) = 0.0000

No hay relación entre la cepa y el tiempo de crecimiento; ya que se observaron desarrollos a diferentes tiempos para cada cepa.

b.2 Cepa estudiada por tipo de crecimiento.

$$\chi^2 = 56.6157$$

Grados de libertad = 16

Significancia (∞) = 0.0000

Los cultivos positivos, negativos o contamina-

dos se pueden presentar en cualquier cepa.

b.3 Cepa estudiada por pH.

$$X^2_c = 10.94$$

$$X^2_t = 26.96$$

Grados de libertad = 16

No existe relación entre los dos factores estudiados. Independientemente del pH hay crecimiento.

b.4 Medio de cultivo por estado de agregación.

$$X^2 = 8.1$$

Grados de libertad = 2

Significancia (α) = 0.0174

Las cepas estudiadas desarrollan en los dos estados de agregación.

b.5 Medio de cultivo por tipo de crecimiento.

$$X^2 = 5.8392$$

Grados de libertad = 4

Significancia (α) = 0.2115

El tipo de crecimiento, negativo, positivo o contaminado depende del medio de cultivo.

b.6 Medio de cultivo por pH.

$$\chi^2 = 81.00$$

Grados de libertad = 4

Significancia (α) = 0.0000

Independientemente del pH se presentan desarrollos en todos los medios.

b.7 Estado de agregación por pH.

$$\chi^2 = 8.1$$

Grados de libertad = 2

Significancia (α) = 0.0174

En los dos valores de pH estudiados hay crecimiento, tanto en los medios sólidos como en los líquidos.

b.8 Tiempo de crecimiento por tipo de crecimiento.

$$\chi^2 = 81$$

Grados de libertad = 20

Significancia (α) = 0.0000

Los cultivos positivos o negativos, así como los contaminados, no están relacionados con el tiempo que tardan en crecer, es decir que se pueden presentar desarrollos a cualquier tiempo.

II. Resultados obtenidos de los cultivos realizados con muestras biológicas.

a. Comparación de los medios de cultivo en estudio con respecto al medio de Löwestein Jensen.

a.1 Análisis general de los cultivos.

Número total de:

Muestras	337
Muestras con baciloscopia positiva ..	250
Muestras con baciloscopia negativa ..	87
Cultivos en Poma Rosa	61
Cultivos en Del Monte	22
Cultivos en Ann O'Brien	86
Cultivos en espárragos verdes	97
Cultivos en espárragos blancos	71
Cultivos en Löwestein Jensen	337
Cultivos	674

a.2 Comparación del crecimiento (positivo se refiere a que sí hubo crecimiento y negativo a que no se presentó desarrollo), en los diferentes medios.

Número total de:

	#	%
Positivos en Poma Rosa	11	18.03
Positivos en Del Monte	2	9.0
Positivos en Ann O'Brien	35	40.77
Positivos en espárragos verdes ..	22	22.70
Positivos en espárragos blancos .	8	11.26
Positivos en Löwestein Jensen ...	180	53.41
Negativos en Poma Rosa	46	75.40
Negativos en Del Monte	19	86.36
Negativos en Ann O'Brien	46	53.48
Negativos en espárragos verdes ..	64	65.97
Negativos en espárragos blancos .	56	78.87
Negativos en Löwestein Jensen ..	107	31.75

a.3 Comparación de la contaminación.

Número de tubos contaminados en:	#	%
Poma Rosa	4	6.5
Del Monte	1	4.5
Ann O'Brien	5	5.8
Espárragos verdes	11	11.34
Espárragos blancos	7	9.8
Löwestein Jensen	50	14.83

a.4 Comparación del tiempo de crecimiento.

Intervalo de tiempo donde aparece el primer crecimiento:

	Día
Poma Rosa	3 - 4
Del Monte	2 - 5
Ann O'Brien	2 - 3
Espárragos verdes	1 - 2
Espárragos blancos	2 - 3
Löwestein Jensen	15 - 19

b. Análisis estadístico de los resultados.

El análisis estadístico se llevó a cabo integrando tablas de contingencia, para determinar las relaciones de independencia o dependencia entre variables, usando como estadística de prueba la variable aleatoria Ji-cuadrada (χ^2). Se llevó a cabo en computadora "Burroughs large Systems".

b.1 Medio por tiempo de crecimiento.

$$\chi^2 = 318.3439$$

Grados de libertad = 124

Significancia (α) = 0.0000

En cualquiera de los medios de cultivo empleados, se observan desarrollos a diferentes tiempos.

b.2 Medio de cultivo por tipo de crecimiento.

$$\chi^2 = 50.9014$$

Grados de libertad = 8

Significancia (α) = 0.0000

Se encuentran contaminaciones, cultivos positivos y negativos en todos los medios.

b.3 Medio de cultivo estudiado por baciloscopia.

$$\chi^2 = 2.4171$$

Grados de libertad = 8

Significancia (α) = 0.9655

El crecimiento presentado en los diferentes medios de cultivo depende de la baciloscopia que haya presentado la muestra, es decir, que las muestras con bacilos abundantes dan mayor número de cultivos positivos que las que tienen pocos o ninguno.

b.4 Tiempo de crecimiento por tipo de crecimiento.

$$\chi^2 = 422.1771$$

Grados de libertad = 62

Significancia (α) = 0.0000

Las contaminaciones y los cultivos positivos o negativos se presentan a cualquier tiempo.

b.5 Tipo de crecimiento por baciloscopia.

$$\chi^2 = 65.7457$$

Grados de libertad = 4

Significancia (α) = 0.0000

Tanto muestras que presentan baciloscopia positiva (bacilos abundantes o escasos), como muestras negativas, dan lugar a cultivos negativos, positivos y contaminados.

b.6 Tiempo de crecimiento por baciloscopia.

$$\chi^2 = 135.8753$$

Grados de libertad = 62

Significancia (α) = 0.0000

b.7 Medio estudiado por tiempo de crecimiento controlado por tipo de crecimiento (creció).

$$\chi^2 = 407.5115$$

Grados de libertad = 124

Significancia (α) = 0.0000

En todos los medios estudiados se encuentran desarrollos característicos a diferentes tiempos.

b.8 Tiempo de crecimiento por tipo de crecimiento controlado por baciloscopia:

Negativa	Escasos	Abundantes
$\chi^2 = 128.68$	$\chi^2 = 128.0$	$\chi^2 = 164.94$
G.l. = 20	G.l. = 48	G.l. = 44
$\alpha = 0.00$	$\alpha = 0.00$	$\alpha = 0.0$

Muestras con baciloscopia negativa, con escasos o abundantes bacilos, dan lugar a cultivos positivos, negativos o contaminados.

b.9 Medio estudiado por tipo de crecimiento controlado por baciloscopia negativa.

$$X^2 = 3.3035$$

Grados de libertad = 8

Significancia (α) = 0.9139

El desarrollo obtenido cuando la muestra presenta baciloscopia negativa, así como que haya cultivos positivos, negativos o contaminados depende del medio de cultivo.

b.10 Medio estudiado por tipo de crecimiento controlado por baciloscopia (bacilos escasos y abundantes).

Escasos

Abundantes

$$X^2 = 31.50$$

$$X^2 = 58.76$$

G.l. = 8

G.l. = 8

$$\alpha = 0.0001$$

$$\alpha = 0.0000$$

Cuando la muestra presenta bacilos escasos o abundantes, los cultivos positivos, negativos y contaminados se presentan en cualquier medio.

b.11 Medio estudiado por tiempo de crecimiento controlado por baciloscopia negativa.

$$\chi^2 = 54.22$$

Grados de libertad = 40

Significancia (α) = 0.0661

Cuando la baciloscopia es negativa el tiempo de desarrollo depende del medio de cultivo.

b.12 Medio estudiado por tiempo de crecimiento controlado por baciloscopia (bacilos escasos y abundantes).

Escasos

Abundantes

$$\chi^2 = 123.12$$

$$\chi^2 = 214.38$$

G.l. = 96

G.l. = 88

$\alpha = 0.0325$

$\alpha = 0.0000$

Cuando la muestra presenta bacilos escasos o abundantes se obtienen cultivos a diferentes tiempos y en cualquier medio.

Los resultados del tipo de crecimiento, tinciones y tipificación, tuvieron las mismas características tanto en las suspensiones bacilares, como en las muestras biológicas cultivadas.

El crecimiento obtenido en Löwestein Jensen es el característico reportado. En el medio en estudio líquido es una nata en la superficie, gruesa, corrugada, difícil de romper.

Los frotis de los cultivos (medio en estudio), fueron variables a las reacciones de Ziehl Neelsen y Gram; pudiéndose clasificar, a la mayoría, como negativas. Las formas bacilares observadas iban desde cocos hasta bacilos alargados, mal teñidos; algunos únicamente se tiñeron en su contorno.

La tipificación se llevó a cabo en el medio de Löwestein Jensen, porque el medio estudiado presenta la desventaja de que en él no se pueden realizar pruebas de tipificación, a excepción de la catalasa, que fue muy variable.

En la tipificación de las muestras biológicas, se encontro que Mycobacterium tuberculosis, era el causante de la enfermedad.

Las suspensiones bacilares se identificaron totalmente.

III. Resultados obtenidos de los cultivos realizados con homogenizado de nódulo leproso.

Todos los cultivos realizados con homogenizado de nódulo leproso fueron negativos y el medio no presentó cambio alguno.

10. CONCLUSIONES

Tomando en cuenta que las micobacterias estudiadas poseen características similares entre sí, pero que cada una presenta un metabolismo específico, se comenta lo siguiente:

1. Las micobacterias desarrollaron a diferentes valores de pH, medios de cultivo y estados de agregación; en tiempo variable.
2. Se observó que las tinciones de Ziehl Neelsen y Gram variaron, cuando se esperaba que siempre hubieran sido positivas.
3. La morfología microscópica también fue variable, pudiéndose encontrar desde formas cocoides hasta bacilares, siendo que no había contaminación.
4. El Löwestein Jensen, que es el medio específico en este caso, presenta también diferencias en los dos aspectos anteriores.

5. En cuanto a desarrollos se observó que el Löwestein Jensen es el que da mejores resultados.
6. Se prefirió el empleo de medio de cultivo líquido, por presentar la ventaja de no llegar a la desecación tan rápidamente como el sólido, además de que el desarrollo es más abundante.
7. En el medio estudiado se observó una ventaja muy importante con respecto al medio de Löwestein Jensen, y es que el crecimiento es tan rápido de las "micobacterias", que ocurre en un lapso de 1 a 3 días, mientras que en el medio tradicional es hasta de 60 días.
8. No se puede asegurar categóricamente que se trate de "micobacterias" (en el caso de los cultivos de muestras biológicas), porque aún no se ha demostrado con pruebas de tipificación, aunque su morfología de crecimiento en el medio líquido corresponde a la reportada en la bibliografía.

9. La morfología del crecimiento en el medio líquido es una nata en la superficie, gruesa y corrugada que varía ligeramente en su color, de una muestra a otra, pudiéndose encontrar café claro, blanca, amarilla o anaranjada.

10. Una de las principales desventajas de este medio de cultivo es que no se pueden hacer pruebas de tipificación en él, por lo que no se puede demostrar que se trate de "mycobacterias", aunque se sospecha, ya que una misma muestra sembrada en el medio en estudio y en Löwestein Jensen da crecimiento positivo a Mycobacterium tuberculosis en este último.

11. Tampoco se pudo demostrar que se tratara de "micobacterias" por la tinción de Ziehl Neelsen, ya que los frotis teñidos por esta técnica, la daban negativa; lo que lleva a pensar que las "micobacterias" cultivadas en el medio en estudio pierden su ácido resistencia.

12. Una explicación del porqué pierden su ácido resistencia, pudiera ser el que las "micobacterias" al crecer tan rápidamente en este medio,

no tienen tiempo para sintetizar todos sus componentes celulares, principalmente, los lípidos que le dan esta propiedad.

13. Otra explicación, pudiera ser, que al cultivarse en este medio se modifique importantemente su composición química.

14. El considerar este cambio en su composición química, se basa en que no dan pruebas de tipificación y además el desarrollo en el medio estudiado no puede ser transferido al medio de Löwestein Jensen o viceversa.

15. Todas las tinciones de los frotis de las muestras cultivadas fueron irregulares, pero se pueden clasificar como Ziehl Neelsen y Gram negativos.

16. Las micobacterias desarrollan en todos los medios de cultivo utilizados, presentando cultivos positivos, negativos o contaminados, independientemente de la baciloscopia que haya presenta

do la muestra y el tiempo de crecimiento.

17. Cuando la baciloscopia es negativa, el tipo y el tiempo de crecimiento dependen del medio de cultivo, debido a que el medio debe ser muy sensible para dar cultivos positivos cuando en la muestra hay pocos o ningún bacilo observable.

18. Cuando en la muestra se encuentran bacilos escasos o abundantes, las micobacterias crecen a diferente tiempo y tipo de crecimiento en cualquiera de los medios.

19. En el medio de cultivo estudiado, el Mycobacterium leprae no pudo ser aislado, esto concuerda con lo reportado hasta el momento, ya que es un microorganismo demasiado exigente que no crece "in vitro".

20. La tuberculosis es una enfermedad endémica en América Latina, por esto es importante encontrar un medio ideal de cultivo que satisfaga las necesidades de un país en vías de desarrollo como México.

21. El medio de cultivo que hasta ahora se ha encontrado que satisface en su mayoría estas necesidades, es el medio de Löwestein Jensen.

22. El medio aquí estudiado, preparado a base de extracto de espárragos, con las variaciones de estado de agregación, pH, diferentes marcas comerciales y naturales (verdes y blancos), presenta algunas desventajas con respecto al medio tradicional, pero tiene algunas ventajas sobre él, como son:

- Las "micobacterias" (de cultivos realizados con muestras biológicas), pueden desarrollar en un tiempo mucho más corto.

- Es más fácil de preparar que el medio tradicional.

- Al realizar el análisis de costo, se observa que es más económico.

11. COMENTARIO

Del estudio realizado con este medio de cultivo (preparado a base de extracto de espárragos), se encontró que tiene desventajas comparándolo con el medio tradicional de Löwestein Jensen, pero que en algunos aspectos lo supera. Hasta la fecha los nuevos medios ensayados no lo han superado totalmente, por lo tanto, se deben hacer pruebas con el fin de estandarizarlos, particularmente el medio aquí trabajado.

Hasta el momento todas las pruebas han sido diseñadas para los medios clásicos, en donde se presentan características bien definidas, por esto se deben planear o rediseñar nuevos métodos para establecer en el nuevo medio, las siguientes características:

- Propiedades tintoriales.
- Propiedades fisiológicas.
 - a. Pruebas de tipificación.
 - b. Pruebas de sensibilidad.
- Inoculación en animales.

A P E N D I C E " A "

Procedimientos de laboratorio utilizados.

1. Colección y manejo de muestras clínicas.

1.1. Esputo.

Se debe instruir al paciente sobre la necesidad de que la muestra provenga de los bronquios o de lo más profundo del pulmón. El esputo obtenido, al despertar el paciente, da bastante seguridad de que corresponda al sitio de la lesión. La saliva o secreciones nasales no son satisfactorias para el estudio (6, 18).

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

El recipiente de recolección debe ser estéril, de plástico o vidrio y que cierre perfectamente..

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

Si la muestra no pudo ser trabajada debe refrigerarse, y si está siendo enviada no debe exceder de 5 días y debe mantenerse en refrigeración.

1.2. Espujo inducido.

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

Hay ocasiones en que el paciente no logra expectorar, o que manifiesta no tener expectoración. En estos casos siempre existe la posibilidad de obtener una muestra por medio de la obtención postural del esputo (6, 18, 44).

1.3. Orina.

Se colecta la porción intermedia de la primera orina de la mañana. Las muestras de más de 24 horas se deben desechar.

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

Cuando no hay posibilidades de que la muestra sea procesada inmediatamente, es necesario mantenerla en refrigeración (1, 16, 20).

2. Procedimientos de laboratorio para microscopía.

2.1. Preparación del frotis.

Para realizar un frotis directo, se toma de las partes más gruesas del material purulento; debido a que en estas zonas es más común encontrar micobacterias.

El material se esparce a través del portaobjetos, tratando de dejar una capa delgada (frotis delgado).

Los portaobjetos utilizados deben ser nuevos ya que los usados anteriormente pueden tener bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR).

Para realizar un frotis por concentración, el sedimento de la muestra homogenizada, se coloca por medio de una pipeta Pasteur en el centro del portaobjetos extendiéndose y dejando una capa delgada del material.

Para fijar el frotis se calienta sobre la flama de un mechero, pasándolo rápidamente tres veces sobre el cono más caliente de la flama; un procedimiento alternativo puede ser el calentar los frotis sobre una platina caliente por dos horas a 65 ó 70°C (1, 12, 18).

2.2. Procedimientos de tinción.

Tinción de Ziehl Neelsen (1, 9, 11, 18).

Reactivos:

- Fucsina básica 1 g
- Alcohol absoluto 10 ml
- Fenol al 5 % 100 ml

Disuélvase la fucsina básica en alcohol y combínese con la solución fenicada.

Alcohol ácido. Se añaden lentamente 3.0 ml de ácido clorhídrico concentrado, a 97 ml de etanol al 90 - 95 %.

Colorante de contraste. Se disuelven 0.5 g de azul de metileno en 100 ml de agua destilada.

Método:

- a) Colocar la laminilla (previamente fijada) en un soporte de varilla sobre un vertedero.
- b) cubrir la laminilla con solución de fucsina básica.
- c) calentar pasándole por el reverso una flama hasta la emisión de vapores, de tres a cinco minutos, evitando la ebullición o la desecación, para lo cual debe reponerse la fucsina que se va evaporando.
- d) Lavar con agua de la llave.

- e) Decolorar con alcohol ácido.
- f) Lavar con agua de la llave.
- g) Teñir con el azul de metileno, durante un minuto.
- h) Lavar con agua de la llave.
- i) Dejar secar por escurrimiento.

Resultado:

Los bacilos ácido resistentes, muestran color rojo, en un medio contrastante azul.

Tinción de Gram, modificación de Hucker (1, 9, 11, 18).

Reactivos:

- Cristal violeta. Se disuelven dos gramos en 80 ml de solución de oxalato de amonio al 1 %; 20 ml de alcohol al 95 % y 80 ml de agua destilada.

- Solución yodo/lugol. Se disuelve 1 gramo de yodo (cristales) y 2 gramos de yoduro de potasio en 100 ml de agua destilada.

- Solución decolorante. Solución 1:1 de alcohol - acetona.

- Colorante de contraste. Disolver 2.5 g de safranina O en 100 ml de etanol al 95 %.

Método:

- a) Tiñase la laminilla (previamente fijada) con cristal violeta durante 10 segundos y tirar el exceso de colorante.
- b) Cubrir la laminilla con lugol durante 10 segundos.
- c) Lávese con agua de la llave.
- d) Decolorar con la solución de alcohol - acetona por 10 a 20 segundos.
- e) Aplicar durante 10 segundos la safranina.
- f) Lávese con rapidez (con agua) y séquese por escurrimiento.

Resultados:

Los organismos Gram positivos aparecen de color azul, los Gram negativos de color rojo.

2.3. Baciloscopias.

Lectura del frotis y reporte de resultados.

La lectura del frotis y el reporte de resultados lo hace el personal de laboratorio encargado de esta actividad, de acuerdo con las siguientes indicaciones:

2.3.1. Lectura del frotis.

Para la observación microscópica se necesita una mesa para el microscopio y el material necesario.

- Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y observar la laminilla con objetivo de inmersión.

- Cada frotis debe examinarse totalmente antes de reportar que no se encontraron BAAR.

- Es suficiente encontrar tres o más bacilos en el frotis para considerarlo positivo.

- El laboratorio solicita nueva muestra de expectoración, cuando se encuentran uno o dos bacilos en todo el frotis.

2.3.2. Reporte de resultados.

Para la preparación del informe de los resultados se recomienda la siguiente escala semicuantitativa:

- Negativo: (-) (NSEBAAR).

No se encontraron bacilos ácido alcohol resistentes, en 100 campos microscópicos observados.

- Positivo: (+).

Muy escasos, menos de un BAAR por campo en 100 campos observados.

- Positivo: (+ +).

Escasos, uno a 10 BAAR por campo en 50 campos observados.

- Positivo: (+ + +).

Numerosos, se encuentran más de 10 BAAR por campo, en 20 campos observados (18).

3. Procedimiento del laboratorio para el aislamiento.

Método de Petroff (con hidróxido de sodio al 4 %).

Para la decontaminación y concentración de la muestra (18).

Reactivos:

- Solución de NaOH al 4 %.
- HCl 2.0 N.
- Rojo de fenol.

Procedimiento:

- a) Añadir el esputo en un tubo de centrifuga con un volumen igual (aproximadamente 2.0 ml) de NaOH al 4 %.
- b) Mezclar en "vortex" hasta la homogenización de la muestra.
- c) Incubar a 37°C por 15 ó 20 minutos.
- d) Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos.
- e) Decantar el sobrenadante en un frasco con desinfectante.

f) Neutralizar el sedimento con HCl 2.0 N, añadir al sedimento una gota del indicador y agregar gota a gota el ácido hasta que el indicador vire a amarillo.

g) Mezclar el sedimento, inocular y hacer frotis.

* Notas:

- El rojo de fenol puede estar incorporado al ácido o al hidróxido de sodio. El proceso de neutralización debe ser muy cuidadoso de manera que el pH del producto a sembrar no sea menor que 6.5 ni mayor de 7.2.

- En este procedimiento, la centrifugación es la etapa más difícil y peligrosa (por la formación de aerosoles), por lo tanto se deben tener las debidas precauciones.

4. Siembra de la muestra:

Esta etapa debe realizarse con el mayor cuidado para evitar la confusión de muestras.

De la misma manera que durante la decontaminación debe trabajarse cerca del mechero.

El número de tubos de medio de cultivo a sembrar por cada muestra varía de un laboratorio a otro, pero es aconsejable utilizar dos tubos por muestra.

El procedimiento para la siembra es el siguiente:

- Colocar sobre la mesa de trabajo dos gradillas, una que contenga los tubos con las muestras ya neutralizadas. El número correlativo del laboratorio debe ser bien visible en cada tubo.

En la segunda gradilla estarán los medios de cultivo necesarios. Si se siembran dos tubos por muestra, ambos deben tener el mismo número de la muestra que en ellos se va a sembrar.

Es muy importante que el primer orificio de la izquierda de cada gradilla este vacío, con el objeto de que durante la siembra se coloque en él el tubo ya utilizado, de esta manera el orificio vacío se va despla-

zando hacia la derecha actuando como punto de separación entre los tubos ya procesados y los por procesar.

- Del producto neutralizado, tomar con una pipeta Pasteur estéril aproximadamente 1.0 ml dejándolo escurrir sobre la superficie del medio sin tocarlo. No es aceptable la siembra directa vaciando de un tubo a otro, porque aumenta considerablemente la contaminación.

- La pipeta Pasteur debe ser flameada después de sacarse del paquete; la boca de los tubos debe flamearse inmediatamente después de abiertos y antes de cerrarlos. Los tubos con el medio de cultivo, mientras estén abiertos, deben mantenerse en posición oblicua.

Una vez sembrados los tubos se colocan sobre una bandeja con fondo inclinado de manera que el líquido sembrado cubra toda la superficie del medio. Se lleva a la incubadora o estufa de cultivo con el tapón suficientemente flojo para que pueda producirse la evaporación de la parte líquida de la siembra.

- Después de 48 horas se revisan los tubos y si se ha evaporado todo el líquido, se ajusta bien la tapa de rosca o se coloca tapón de caucho a los que

estaban con algodón. Es de mucha importancia que la evaporación del líquido sea completa antes de ajustar el tapón, pues ello asegura la fijación de los microorganismos sobre la superficie del medio. Si los tubos quedan con líquido, este arrastrará los bacilos hacia el fondo al moverlos para hacer su observación y además el exceso de humedad altera la morfología de las colonias.

- Posteriormente los tubos pueden ser mantenidos hasta el mínimo del período de observación en posición horizontal. Esto es lo más práctico cuando se dispone de una amplia cámara de cultivo; es recomendable para este objeto usar cajas de fondo inclinado. Si sólo se dispone de una pequeña estufa de cultivo puede ser más útil la posición vertical de los tubos pues significa ocupar menos espacio.

La incubación de los tubos sembrados debe hacerse a una temperatura que como máximo varíe entre 35 y 37°C, para ello es necesario controlar periódicamente la cámara o estufa (18).

A P E N D I C E " B "

Pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación de las micobacterias.

1. Niacina.

Material:

Se requieren tubos estériles de 16 por 125 mm.

Reactivos:

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

Procedimiento:

En un tubo de cultivo con desarrollo mínimo de 4 semanas, se añade 1.0 ml de solución salina o agua

destilada estériles, después de la extracción se deja reposar por 15 minutos. Tomar 0.5 ml de fluido y transferirlo a otro tubo, añadiendo 0.5 ml de anilina (la solución no debe ser colorida), posteriormente añadir 0.5 ml de bromuro de cianógeno, produciéndose un color amarillo, que generalmente aparece de inmediato (8, 12, 37, 38).

2. Catalasa.

Material:

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

Reactivos:

Solución al 30 % de peróxido de hidrógeno almacenada en refrigeración; solución al 10 % de Tween 80* esterilizada en autoclave por 10 minutos. El sustrato se prepara mezclando volúmenes iguales de Tween 80* y peróxido de hidrógeno. Se utiliza también solución amortiguadora

* Marca registrada.

de fosfatos 1/15 M a pH de 7.0.

Procedimiento:

En la prueba a temperatura ambiente, se añaden una o dos gotas de la mezcla o sustrato al medio de cultivo sólido, donde hay desarrollo bacteriano. Observar la formación de burbujas, en un máximo de 5 minutos (6, 8, 12, 18, 29, 34).

3. Arilsulfatasa.

Material:

Tubos de 18 por 60 mm con tapón de rosca.

Reactivos:

Para la elaboración de sustrato se incorpora 1 ml de glicerol y 65 mg de la sal disulfato trisódico de fenoftaleína, esterilizada por filtración, en 100 ml de base de agar oleico de Dubos fundido, esterilizado en autoclave. Colocar 2 ml de sustrato en tubos con tapón de rosca. Se requiere también de solución de carbonato de sodio 1 M.

Procedimiento:

Inocular una gota de la suspensión bacilar en los tubos con base de agar oleico de Dubos, incubando a 37°C por tres días, y por dos semanas para las micobacterias de crecimiento lento, añadir 1.0 ml de solución de carbonato de sodio y observar una coloración rosa de la fenoftaleína libre. Se reporta en cruces de 1 a 5 de acuerdo a estándares preparados con una solución base de fenoftaleína al 0.1 % en agua destilada (6, 13, 18).

4. Reducción de nitratos.

Material:

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

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

Reactivos:

Acido clorhídrico concentrado diluido 1:2,

solución al 2 % de NaNO_3 0.01 M en amortiguador de fosfatos 0.022 M a $\text{pH}=7.0$ y polvo de zinc. Las soluciones se mantienen a temperatura ambiente.

Procedimiento:

Colocar unas gotas de agua destilada estéril en un tubo con tapón de rosca, añadiendo una asada del desarrollo y 2.0 ml de NaNO_3 . Agitar la mezcla e incubar en un baño a 37°C por dos horas. Se añaden, 1 gota de HCl , 2 gotas de N-naftilendiamida y 2 gotas de sulfanilamida. Examinar inmediatamente el desarrollo de un color rojo a rosa.

A los tubos negativos se les añade polvo de zinc y este reduce el nitrato a nitrito (1, 8, 13, 18).

5. Hidrólisis del Tween 80*.

Material:

Tubos de 16 por 125 mm con tapón de rosca.

* Marca registrada.

Reactivos:

Para el sustrato se combinan 100 ml de amortiguador de fosfatos, 0.5 ml de Tween 80* y 2.0 ml de solución acuosa al 1 % de rojo neutro. Colocar 2.0 ml de sustrato en los tubos y esterilizar en autoclave durante 10 minutos, después de esterilizar, el líquido tiene un color ámbar, por no más de dos semanas.

Procedimiento:

Suspender en el tubo con sustrato una asada del desarrollo bacteriano e incubar a 37°C. El desarrollo de un color rosa indica un resultado positivo, los tubos se leen a las 24 horas, 5 y 10 días; es importante no agitar los tubos cuando se realizan las lecturas (6, 8, 12, 18).

6. Reducción del telurito:

Material:

Tubos de 20 por 50 mm con tapón de rosca.

* Marca registrada.

Los cultivos de aproximadamente 7 días, se emulsionan en 5.0 ml de medio de Middlebrook 7H9 contenido en los tubos, este desarrollo debe ser turbio.

Reactivos:

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

Procedimiento:

Añadir 2 gotas de solución de telurito a los tubos que contienen el medio de Middlebrook 7H9 e incubar a 37°C por un período de 7 días, examinando los tubos cada día. Un precipitado negro indica una prueba positiva (6, 18).

A P E N D I C E " C "

Tablas empleadas en el Análisis Estadístico:

- I. Tablas de los resultados obtenidos del trabajo realizado con cepas puras (Tablas # 1 a 8).

- II. Tablas de los resultados obtenidos del trabajo con -
muestras biológicas (Tablas # 1 a 16).

TABLA # 1. CEPA ESTUDIADA POR TIEMPO DE CRECIMIENTO.

CEPA ESTUDIADA	TIEMPO DE CRECIMIENTO (DIAS)											#	%
	0	1	2	3	4	7	10	15	21	22	28		
<u>M. xenopi</u>	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	11.1
<u>M. marinum</u>	8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	9	11.1
<u>M. phlei</u>	0	0	0	6	3	0	0	0	0	0	0	9	11.1
<u>M. avium</u>	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6	9	11.1
<u>M. tuberculosis</u>	8	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	9	11.1
<u>M. nonchromogenicum</u>	2	0	0	1	0	0	0	2	2	2	0	9	11.1
<u>M. smegmatis</u>	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	11.1
<u>M. microti</u>	2	0	0	0	1	1	2	3	0	0	0	9	11.1
<u>M. kansasii</u>	1	0	1	0	4	0	1	2	0	0	0	9	11.1
#	23	18	1	7	9	1	3	8	3	2	6	81	100
%	28	22	1	9	11	1	4	10	4	2.5	7		

$$\chi^2 = 269.99534$$

Grados de libertad = 80

Significancia (α) = 0.0000

TABLA # 2. CEPA ESTUDIADA POR TIPO DE CRECIMIENTO.

CEPA ESTUDIADA	TIPO DE CRECIMIENTO			#	%
	CONTAMINADO	NO CRECIO	CRECIO		
<u>M. xenopi</u>	0	0	9	9	11.1
<u>M. marinum</u>	0	8	1	9	11.1
<u>M. phlei</u>	0	0	9	9	11.1
<u>M. avium</u>	1	1	7	9	11.1
<u>M. tuberculosis</u>	0	8	1	9	11.1
<u>M. nonchromogenicum</u>	0	2	7	9	11.1
<u>M. smegmatis</u>	0	0	9	9	11.1
<u>M. microti</u>	0	0	9	9	11.1
<u>M. kansasii</u>	0	1	8	9	11.1
	# 2	21	58	81	100
	% 2.5	25.9	71.6		

$$X^2 = 56.61$$

Grados de libertad = 16

Significancia (α) = 0.0000

TABLA # 3. CEPA ESTUDIADA POR pH.

CEPA ESTUDIADA	PORCENTAJE DE CRECIMIENTO A pH			#
	7.0	7.2	NEUTRO*	
<u>M. xenopi</u>	100	100	100	300
<u>M. marinum</u>	0	0	100	100
<u>M. phlei</u>	100	100	100	300
<u>M. avium</u>	75	100	100	275
<u>M. tuberculosis</u>	0	0	100	100
<u>M. nonchromogenicum</u>	75	75	100	250
<u>M. smegmatis</u>	100	100	100	300
<u>M. microti</u>	75	75	100	250
<u>M. kansasii</u>	100	75	100	275
#	625	625	900	2150

* El pH denominado neutro, corresponde al del medio de Löwestein Jensen.

$$\chi^2_c = 10.94$$

$$\chi^2_t = 26.92$$

Grados de libertad = 16

TABLA # 4. CRECIMIENTO DE LAS CEPAS POR ESTADO DE
AGREGACION DEL MEDIO DE CULTIVO

CEPA ESTUDIADA	PORCENTAJE DE CRECIMIENTO		#	
	SOLIDO	LIQUIDO		
<u>M. xenopi</u>	100	100	200	
<u>M. marinum</u>	20	0	20	
<u>M. phlei</u>	100	100	200	
<u>M. avium</u>	80	100	180	
<u>M. tuberculosis</u>	20	0	20	
<u>M. nonchromogenicum</u>	60	100	160	
<u>M. smegmatis</u>	100	100	200	
<u>M. microti</u>	80	75	155	
<u>M. kansasii</u>	80	100	180	
	#	640	675	1315
	%	49	51	100

$$\chi^2 = 8.1$$

Grados de libertad = 8

Significancia (α) = 0.0174

TABLA # 5. MEDIO DE CULTIVO ESTUDIADO POR
TIPO DE CRECIMIENTO

MEDIO DE CULTIVO	TIPO DE CRECIMIENTO			#	
	CONTAMINADO	NO CRECIO	CRECIO		
ESPARRAGOS					
NATURALES	1	8	27	36	
VERDES				44.4 %	
ESPARRAGOS					
COMERCIALES	1	13	22	36	
Ann O'Brien				44.4 %	
LOWESTEIN	0	0	9	9	
JENSEN				11.1 %	
	#	2	21	58	81
	%	2.5	25.9	71.6	100

$$\chi^2 = 5.8392$$

$$\text{Grados de libertad} = 4$$

$$\text{Significancia } (\alpha) = 0.2115$$

TABLA # 6. MEDIO DE CULTIVO ESTUDIADO POR pH

MEDIO DE CULTIVO	pH			#	%	
	7.0	7.2	NEUTRO*			
ESPARRAGOS NATURALES VERDES	18	18	0	36	44.4	
ESPARRAGOS COMERCIALES Ann O'Brien	18	18	0	36	44.4	
LOWESTEIN JENSEN	0	0	9	9	11.1	
	#	36	36	9	81	100
	%	44.4	44.4	11.1	100	

* El pH denominado neutro, corresponde al del medio de Löwestein Jensen.

$$\chi^2 = 81.00$$

Grados de libertad = 4

Significancia (α) = 0.0000

TABLA # 7. ESTADO DE AGREGACION DEL MEDIO DE

CULTIVO POR pH

ESTADO DE AGREGACION	pH			#	%
	7.0	7.2	NEUTRO*		
SOLIDO	18	18	0	36	44.4
LIQUIDO	18	18	9	45	55.6

#	36	36	9	81	100
%	44.4	44.4	11.1	100	

* El pH denominado neutro, corresponde al del medio de Löwestein Jensen.

$$X^2 = 8.1$$

Grados de libertad = 2

Significancia (α) = 0.0174

TABLA # 8. TIEMPO DE CRECIMIENTO EN DIAS POR

TIPO DE DESARROLLO

TIEMPO DE CRECIMIENTO (DIAS)	TIPO DE DESARROLLO				
	CONTAMINADO	NO CRECIO	CRECIO	#	%
0	2	21	0	23	28.4
1	0	0	18	18	22.2
2	0	0	1	1	1.2
3	0	0	7	7	8.6
4	0	0	9	9	11.1
7	0	0	1	1	1.2
10	0	0	3	3	3.7
15	0	0	8	8	9.9
21	0	0	3	3	3.7
22	0	0	2	2	2.5
28	0	0	6	6	7.4

#	2	21	58	81
%	2.5	25.9	71.6	100

$$\chi^2 = 81.00$$

Grados de libertad = 20

Significancia (∞) = 0.0000

TABLA # I. MEDIO ESTUDIADO POR TIEMPO DE CRECIMIENTO EN DIAS

MEDIO DE CULTIVO	TIEMPO DE CRECIMIENTO (DIAS)																																				
	0	1	2	3	4	5	7	10	11	12	14	15	17	18	19	20	21	22	23	26	27	28	30	32	33	33	41	42	43	60		68					
LOWESTER																																					217
JENSEN	97	0	0	0	0	0	0	2	1	0	6	13	1	4	29	13	1	7	5	5	4	1	10	3	1	3	2	1	1	2	3	2			50.2 %		
ESPARRAGOS COMERCIALES Ann O'Brien	41	1	0	22	8	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		75	
ESPA RAGOS COMERCIALES del Monte	20	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		22	
ESPARRAGOS COMERCIALES Rosa Rosa	59	0	0	8	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		61	
ESPARRAGOS NATURALES	57	0	0	4	14	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		57	

No.	245	1	1	34	22	2	1	2	2	3	6	13	1	4	29	13	3	7	5	5	4	1	10	3	1	3	2	1	1	2	3	2		432
*	56.7	0.2	0.2	7.9	5.1	0.5	0.2	0.5	0.5	0.7	1.4	3.0	0.2	0.9	6.7	3.0	0.7	1.6	1.2	1.2	0.9	0.2	2.3	0.7	0.2	0.7	0.5	0.2	0.2	0.5	0.7	0.5		100

$\chi^2 = 318.3439$

Grados de libertad = 124

Significancia (∞) = 0.0000

TABLA # 2. MEDIO DE CULTIVO ESTUDIADO POR
TIPO DE CRECIMIENTO

MEDIO DE CULTIVO		TIPO DE CRECIMIENTO		
		CONTAMINADO	NO CRECIO	CRECIÓ
LOWESTEIN	#	27	71	119 217
JENSEN	%	12.4	32.7	54.8 50.2
ESPARRAGOS COMERCIALES	#	4	37	34 75
Ann O'Brien	%	5.3	49.3	45.3 17.4
ESPARRAGOS COMERCIALES	#	1	19	2 22
Del Monte	%	4.5	86.4	9.1 5.1
ESPARRAGOS COMERCIALES	#	8	42	11 61
Poma Rosa	%	13.1	68.9	18.0 14.1
ESPARRAGOS NATURALES	#	5	32	20 57
	%	8.5	56.1	35.1 13.1
	#	45	201	186 432
	%	10.4	46.5	43.1 100

$$\chi^2 = 50.90147$$

Grados de libertad = 8

Significancia (α) = 0.0000

TABLA #3. MEDIO DE CULTIVO ESTUDIADO POR BACILOSCOPIA

MEDIO DE CULTIVO		BACILOSCOPIA			
		NEGATIVO	ESCASOS BACILOS	ABUNDANTES BACILOS	
LOWESTEIN	#	69	65	83	217
JENSEN	%	31.8	30	38.2	50.2
ESPARRAGOS					
COMERCIALES	#	22	21	32	75
Ann O'Brien	%	29.3	28	42.7	17.4
ESPARRAGOS					
COMERCIALES	#	5	6	11	22
Del Monte	%	22.7	27.3	50	5.1
ESPARRAGOS					
COMERCIALES	#	21	19	21	61
Poma Rosa	%	34.4	31.1	34.4	14.1
ESPARRAGOS					
NATURALES	#	19	17	21	61
	%	33.3	28.9	36.8	13.2
	#	136	128	168	432
	%	31.5	29.6	39.8	100

$$X^2 = 2.41711$$

Grados de libertad = 8

Significancia (α) = 0.9655

TABLA # 4. TIEMPO DE CRECIMIENTO EN DIAS POR TIPO DE CRECIMIENTO

TIPO DE CRECIMIENTO	TIEMPO DE CRECIMIENTO (DIAS)																							
	0	1	2	3	4	5	7	10	11	12	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	26	27	28	
CONTAMINADO	#	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NO CRECIO	#	199	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
CRECIO	#	1	1	1	34	22	2	1	2	2	3	6	13	1	4	28	13	3	7	5	5	4	1	10
	#	245	1	1	34	22	2	1	2	2	3	6	13	1	4	29	13	3	7	5	5	4	1	10
	%	56.7	0.2	0.2	7.9	5.1	0.5	0.2	0.5	0.5	0.7	1.4	3.0	0.2	0.9	6.7	3.0	0.7	1.6	1.2	1.2	0.9	0.2	2

CONTINUACION DE LA TABLA # 4.

TIPO DE CRECIMIENTO	TIEMPO DE CRECIMIENTO (DIAS)									
	30	32	33	38	41	42	43	60	68	
CONTAMINADO	#	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NO CRECIO	#	0	0	0	1	0	0	0	0	0
CRECIO	#	3	1	3	1	1	1	2	3	2
	#	3	1	3	2	1	1	2	3	2
	%	0.7	0.2	0.7	0.5	0.2	0.2	0.5	0.7	0.5

$$X^2 = 422.17715$$

Grados de libertad = 62

Significancia (α) = 0.0000

TABLA # 5. TIEMPO DE CRECIMIENTO POR BACILOSCOPIA

TIEMPO DE CRECIMIENTO (DIAS)	BACILOSCOPIA			
	NEGATIVA	ESCASOS	ABUNDANTES	
0	115	64	66	245
1	0	0	1	1
2	0	1	0	1
3	8	9	17	34
4	3	4	15	22
5	1	1	0	2
7	0	1	0	1
10	0	0	2	2
11	1	0	1	2
12	0	1	2	3
14	0	2	4	6
15	0	4	9	13
16	0	0	1	1
17	1	2	1	4
18	2	5	22	29
19	1	8	4	13
20	0	2	1	3
21	0	4	3	7
22	2	3	0	5
23	0	1	4	5
26	0	3	1	4
27	1	1	1	3
28	0	4	6	10
30	0	0	3	3
32	1	0	0	1
33	0	1	2	3

CONTINUACIÓN DE LA TABLA # 5.

TIEMPO DE CRECIMIENTO (DIAS)	BACILOSCOPIA			
	NEGATIVA	ESCASOS	ABUNDANTES	
38	0	1	1	2
41	0	1	0	1
42	0	1	0	1
43	0	2	0	2
60	0	2	1	3
68	0	1	1	2
#	136	128	168	432
%	31.5	29.6	38.9	100

$$\chi^2 = 135.87533$$

Grados de libertad = 62

Significancia (α) = 0.0000

TABLA # 6. TIPO DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO POR
MEDIO DE CULTIVO

TIPO DE CRECIMIENTO		BACILOSCOPIA			
		NEGATIVA	ESCASOS Y ABUNDANTES		
CONTAMINADO	#	15	13	17	45
	%	33.3	28.9	37.8	10.4
NO CRECIO	#	99	51	51	201
	%	49.3	25.4	25.4	46.5
CRECIO	#	22	64	100	186
	%	11.8	34.4	53.8	43.1
	#	136	128	168	432
	%	31.5	29.6	38.9	100

$$\chi^2 = 65.74578$$

Grados de libertad = 4

Significancia (α) = 0.0000

TABLA # 8. TIEMPO DE CRECIMIENTO POR TIPO DE CRECIMIENTO
CONTROLADO POR BACILOSCOPIA NEGATIVA

TIEMPO DE CRECIMIENTO (DIAS)	TIPO DE CRECIMIENTO			#	%
	CONTAMINADO	NO CRECIO	CRECIO		
0	15	99	1	115	84.6
3	0	0	8	8	5.9
4	0	0	3	3	2.2
5	0	0	1	1	0.7
11	0	0	1	1	0.7
17	0	0	1	1	0.7
18	0	0	2	2	1.5
19	0	0	1	1	0.7
22	0	0	2	2	1.5
27	0	0	1	1	0.7
32	0	0	1	1	0.7
#	15	99	22	136	
%	11	72.8	16.2	100	

$$\chi^2 = 128.68933$$

Grados de libertad = 20

Significancia (α) = 0.0000

TABLA # 9. TIEMPO DE CRECIMIENTO POR TIPO DE CRECIMIENTO
CONTROLADO POR BACILOSCOPIA (ESCASOS BACILOS)

TIEMPO DE CRECIMIENTO (DIAS)	TIPO DE CRECIMIENTO			#	%
	CONTAMINADO	NO CRECIO	CRECIO		
0	13	51	0	64	50
2	0	0	1	1	0.8
3	0	0	9	9	7.0
4	0	0	4	4	3.1
5	0	0	1	1	0.8
7	0	0	1	1	0.8
12	0	0	1	1	0.8
14	0	0	2	2	1.6
15	0	0	4	4	3.2
17	0	0	2	2	1.6
18	0	0	5	5	3.9
20	0	0	2	2	1.6
21	0	0	4	4	3.2
22	0	0	3	3	2.3
23	0	0	1	1	0.8
26	0	0	3	3	2.3
28	0	0	4	4	3.2
33	0	0	1	1	0.8
38	0	0	1	1	0.8
41	0	0	1	1	0.8
42	0	0	1	1	0.8
43	0	0	2	2	1.6
60	0	0	2	2	1.6
68	0	0	1	1	0.8
	#	13	51	64	128
	%	10.2	39.8	50	100

$$\chi^2 = 128.00$$

Grados de libertad = 48

Significancia (α) = 0.0000

TABLA #10. TIEMPO DE CRECIMIENTO POR TIPO DE CRECIMIENTO
CONTROLADO POR BACILOSCOPIA (ABUNDANTES BACILOS)

TIEMPO DE CRECIMIENTO (DIAS)	TIPO DE CRECIMIENTO			#	%
	CONTAMINADO	NO CRECIO	CRECIO		
0	17	49	0	66	39.3
1	0	0	1	1	0.6
3	0	0	17	17	10.1
4	0	0	15	15	8.9
10	0	0	2	2	1.2
11	0	0	1	1	0.6
12	0	0	2	2	1.2
14	0	0	4	4	2.4
15	0	0	9	9	5.4
16	0	0	1	1	0.6
17	0	0	1	1	0.6
18	0	1	21	22	13.1
19	0	0	4	4	2.4
20	0	0	1	1	0.6
21	0	0	3	3	1.8
23	0	0	4	4	2.4
26	0	0	1	1	0.6
28	0	0	6	6	3.6
30	0	0	3	3	1.8
33	0	0	2	2	1.2
38	0	1	0	1	0.6
60	0	0	1	1	0.6
68	0	0	1	1	0.6
#	17	51	100	168	
%	10.1	30.4	59.5	100	

$$\chi^2 = 164.94895$$

Grados de libertad = 44

Significancia (α) = 0.0000

TABLA # 11. MEDIO ESTUDIADO POR TIPO DE CRECIMIENTO
CONTROLADO POR BACILOSCOPIA NEGATIVA

MEDIO DE CULTIVO		TIPO DE CRECIMIENTO			
		CONTAMINADO	NO CRECIO	CRECIO	
LOWESTEIN	#	8	51	10	69
JENSEN	%	11.6	73.9	14.5	50.7
ESPARRAGOS					
COMERCIALES	#	3	15	4	22
Ann O'Brien	%	13.6	68.2	18.2	16.2
ESPARRAGOS					
COMERCIALES	#	0	4	1	5
Del Monte	%	0	80	20	3.7
ESPARRAGOS					
COMERCIALES	#	2	17	2	21
Poma Rosa	%	9.5	81	9.5	15.4
ESPARRAGOS					
NATURALES	#	2	12	5	19
	%	10.5	63.2	26.3	14
	#	15	99	22	136
	%	11	72.8	16.2	100

$$\chi^2 = 3.30356$$

Grados de libertad = 8

Significancia (α) = 0.9139

TABLA # 12. MEDIO ESTUDIADO POR TIPO DE CRECIMIENTO
CONTROLADO POR BACILOSCOPIA (ESCASOS BACILOS)

MEDIO DE CULTIVO		TIPO DE CRECIMIENTO			
		CONTAMINADO	NO CRECIO	CRECIO	
LOWESTEIN	#	8	11	46	65
JENSEN	%	12.3	16.9	70.8	50.8
ESPARRAGOS COMERCIALES	#	0	5	1	6
Del Monte	%	0	83.3	16.7	4.7
ESPARRAGOS COMERCIALES	#	1	13	7	21
Ann O'Brien	%	4.8	61.9	33.3	16.4
ESPARRAGOS COMERCIALES	#	2	11	6	19
Ann O'brien	%	10.5	57.9	31.6	14.8
ESPARRAGOS NATURALES	#	2	11	4	17
	%	11.8	64.7	23.5	13.3
	#	13	51	64	128
	%	10.2	39.8	50	100

$$\chi^2 = 31.5076$$

Grados de libertad = 8

Significancia (α) = 0.0001

TABLA # 13. MEDIO ESTUDIADO POR TIPO DE CRECIMIENTO
CONTROLADO POR BACILOSCOPIA (ABUNDANTES BACILOS)

MEDIO DE CULTIVO		TIPO DE CRECIMIENTO		
		CONTAMINADO	NO CRECIO	CRECIO
LOWESTEIN	#	11	9	63 83
JENSEN	%	13.3	10.8	75.9 49.4
ESPARRAGOS				
COMERCIALES	#	0	9	23 32
Ann O'Brien	%	0	28.1	71.9 19
ESPARRAGOS				
COMERCIALES	#	1	10	0 11
Del Monte	%	9.1	90.9	0 6.5
ESPARRAGOS				
COMERCIALES	#	4	14	3 21
Poma Rosa	%	19	66.7	14.3 12.5
ESPARRAGOS	#	1	9	11 21
NATURALES	%	4.8	42.9	52.4 12.5
	#	17	51	100 168
	%	10.1	30.4	59.5 100

$$\chi^2 = 58.76457$$

Grados de libertad = 8

Significancia (α) = 0.0000

TABLA # 14. MEDIO ESTUDIADO POR TIEMPO DE CRECIMIENTO

CONTROLADO POR BACILOSOPIA NEGATIVA

MEDIO DE CULTIVO	TIEMPO DE CRECIMIENTO (DIAS)											#	%
	0	3	4	5	11	17	18	19	22	27	32		
LOWESTEIN JENSEN	60	0	0	0	1	1	2	1	2	1	1	69	51
ESPARRAGOS COMERCIALES Ann O'Brien	18	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	22	16
ESPARRAGOS COMERCIALES Del Monte	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	5	4
ESPARRAGOS COMERCIALES Poma Rosa	19	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	15
ESPARRAGOS NATURALES	14	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	19	14
#	115	8	3	1	1	1	2	1	2	1	1	136	
%	85	6	2	0.7	0.7	0.7	1.5	0.7	1.5	0.7	0.7	100	

$$\chi^2 = 54.22029$$

Grados de libertad = 40

Significancia (∞) = 0.0661

TABLA # 15. MEDIO ESTUDIADO POR TIEMPO DE CRECIMIENTO
CONTROLADO POR BACILOSCOPIA (BACILOS ESCASOS)

MEDIO DE CULTIVO	TIEMPO DE CRECIMIENTO (DIAS)										
	0	2	3	4	5	7	12	14	17	18	19
LOWESTEIN											
JENSEN	19	0	0	0	0	0	0	2	4	5	8
ESPARRAGOS COMERCIALES											
Ann O'Brien	14	0	4	1	0	1	1	0	0	0	0
ESPARRAGOS COMERCIALES											
Del Monte	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESPARRAGOS COMERCIALES											
Poma Rosa	13	0	4	0	1	0	0	0	0	0	0
ESPARRAGOS NATURALES											
	13	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0
#	64	1	9	4	1	1	1	2	4	2	8
%	50	0.8	7.0	3.1	0.8	0.8	0.8	1.6	3.1	1.6	6.3

CONTINUACION DE LA TABLA # 15

TIEMPO DE CRECIMIENTO (DIAS)												
20	21	22	23	26	28	33	38	41	42	43	60	68
1	4	3	1	3	4	1	1	1	1	2	2	1 65 50.8%
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 21 16.4%
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 6 4.7%
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 19 14.8%
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 17 13.3%
2	4	3	1	3	4	1	1	1	1	2	2	1 128
1.6	3.1	2.3	0.8	2.3	3.1	0.8	0.8	0.8	0.8	1.6	1.6	0.8 100

$$\chi^2 = 123.1227$$

Grados de libertad = 96

Significancia (α) = 0.0325

TABLA # 16. MEDIO ESTUDIADO POR TIEMPO DE CRECIMIENTO
CONTROLADO POR BACILOSCOPIA (BACILOS ABUNDANTES)

MEDIO DE CULTIVO	TIEMPO DE CRECIMIENTO (DIAS)											
	0	1	3	4	10	11	12	14	15	16	17	18
LOWESTEIN												
JENSEN	18	0	0	0	2	0	0	4	9	1	1	26
ESPARRAGOS												
COMERCIALES												
Ann O'Brien	9	1	15	6	0	0	1	0	0	0	0	0
ESPARRAGOS												
COMERCIALES												
Del Monte	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESPARRAGOS												
COMERCIALES												
Poma Rosa	18	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESPARRAGOS												
NATURALES	10	0	0	9	0	1	1	0	0	0	0	0
#	66	1	17	15	2	1	2	4	9	1	1	26
%	39.3	0.6	108.9	1.2	0.6	1.2	2.4	5.4	0.6	0.6	15.5	

CONTINUACION DE LA TABLA # 16

		TIEMPO DE CRECIMIENTO (DIAS)								
3	23	26	28	30	33	38	60	68		
3	4	1	6	3	2	1	1	1	83 49.4%	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	32 19.0%	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	11 12.5%	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	21 12.5%	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	21 12.5%	
4	4	1	6	3	2	1	1	1	168	
2.4	2.4	0.6	3.6	1.8	1.2	0.6	0.6	0.6	100	

$$\chi^2 = 214.38251$$

Grados de libertad = 88

Significancia (α) = 0.0000

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

Libros y manuales:

1. Allen y Baker: Mycobacteria. Aislamiento y pruebas de sensibilidad. 1a. ed., México, 1976. Ed. El Manual Moderno.
2. Bojalil, L. F., et al.: Microbiología Médica. 1a. ed., México, 1981. Ed. Mendez Oteo, pp. 39 - 84.
3. Bryceson, A., Pfaltzgraff, A.: Leprosy. 2a. ed., - Edinburgh London and New York, 1980. Ed. Churchill Livingstone.
4. Burrows, W.: Tratado de Microbiología. 20a. ed., - México, 1977. Ed. Interamericana.
5. Burdon y Williams: Microbiología. 1a. ed., México, 1978. Publicaciones Cultural, pp. 655 - 674.
6. Calderón, G. P.: La importancia clínica de las Mycobacterias diferentes de Mycobacterium tuberculosis. Tesis, U.N.A.M., 1982.

7. Carpenter, P. L.: Microbiología. 4a. ed., México, 1979. Ed. Interamericana, pp. 136, 422.
8. Cowan y Steel's: Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica. 2a. ed., México, 1974. Ed. C E C S A .
9. Davis, B. D., Dulbecco, R.: Tratado de Microbiología. 2a. ed., Barcelona, 1980. Ed. Salvat, pp. 868 - 891.
10. David, L. H.: Bacteriology of the Mycobacteriosis Center for Disease Control. U. S. Department of Health. Education and Welfare, 1976.
11. Dubos, R. J., and Hirsch, J. G. (eds): Bacterial and Mycotic Infections of man. 4th ed. Philadelphia J. B., Lippincott Company, 1965.
12. Koneman, Allen, et al: Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. Edited by Lippincott Company.
13. Mac Faddin, J. F.: Manual de Pruebas Bioquímicas.

14. Piatkin, K. D., Drivoshein, Y. S.: Microbiología. - 2a. ed., U. R. S. S., 1981. Ed. Mir Moscú pp. - 399 - 411.
15. Publ. Hlth. Ser. Publ. No. 1547. Washington, D. C. U. S. Gouvernente Printing Office.
16. Rigau, A.: Cultivo de Espárragos. 2a. ed., España, 1966. Ed. Sintés. pp. 32 - 34.
17. Rose, A. H.: Microbiología Química. 2a. ed., 1977. Ed. Alhambra.
18. Secretaria de Salubridad y Asistencia. Subsecretaria de Salubridad. Dirección General de Control de la Tuberculosis y de las Enfermedades del Aparato Respiratorio. "Curso sobre bacteriología de la Tuberculosis". 1978.
19. Servicio de Ciencia y Política de la Alimentación. Dirección de Nutrición, F. A. O. Contenido en Aminoácidos de los Alimentos y datos Biológicos sobre Proteínas. Roma, 1970.

20. Shabad, A. L.: Manual de Urología. U. R. S. S., -
1982. Ed. Mir Moscú. pp. 152 - 159.
21. Wilson, E. D.: Principles of Nutrition. 4a. ed., -
U. S. A., 1979. pp. 498, 500 - 503.

Revistas:

22. A differential medium for Mycobacteria. Am. Rev. -
Resp. Dis. 89:108 (1964).
23. Bojalil, L. F., Cerbón, J., et al.: Adansonian Cla-
ssification of Mycobacteria. J. Gen. Microl. -
28:333 (1962).
24. Chapman, J. S., Dallas, M. D.: The Ecology of the -
Atypical Mycobacteria. Arch. Environ. Health -
22:41 (Jan. 1977).
25. Cummins, D. S.: Chemical Composition and Antigenic
Structure of Cell Walls of Corynebacterium, - - -
Mycobacterium, Nocardia, Actinomyces and - - - -
Anthrobacter. J. Gen. Microbiol. 28:35 (1962).
26. Davison, T. P.: The other Mycobacteria. Chest. -
75:2, 110 (1979).

27. Dubos, R. J., Bernard, D. D., et al.: The effect of water soluble lipids on the growth and biological properties of Tubercle bacilli.
28. Dubos, R. J. and Middlebrook, G.: Media for Tubercle bacilli. Am. Rev. Tuberc. 56:334 (1947).
29. Gagnon, M., et al.: New Method for Catalase Determination. Analyt. Chem. 31:144 (1959).
30. Gordon, R. E. and Smith, M. M.: Rapidly Growing, acid fast Bacteria. J. Bact. 66:41 (1953).
31. Hiller, Ch.: Fluorostaining of Tubercle Bacilli. Am. Rev. Resp. Dis. 95:1068 (1971).
32. Kubica, G. P.: Differential identification. VIII Key features for identification of clinically significant Mycobacteria. Am. Rev. Resp. Dis. 107:9 (1973).
33. Kubica, G.P., Gordon, R. F., et al.: A co-operative numerical analysis of rapidly growing Mycobacteria. J. Gen. Microbiol. 73:55 (1972).

34. Kubica, G. P., Pool, G. L.: Studies on the catalase activity of acid-fast bacilli. Am. Rev. Resp. Dis. 81:387 (1960).
35. Kubica, G. P., Vella, A. S., et al.: Numerical taxonomy of selected slowly growing Mycobacteria. J. Gen. Microbiol. 74:159 (1973).
36. Lorian, V., Lacasse, S. D., et al.: Comparison between 7H10, WR 1339, and Löwenstein Medium in the Isolation and Sensivity test of Mycobacteria from 4,000 sputum specimens. Am. Rev. Resp. Dis. 94:502 (1966).
37. Neimeister, R. P.: A Preliminary report on the technique of extractin niaccin from Mycobacterium tuberculosis cultured on 7H10 agar. Am. Rev. Resp. Dis. 100:401 (1969).
38. Pope, H., Smith, D. T.: Synthesis of B-complex vitamins by Tubercle bacilli when grown on synthetic media. Am. Rev. Tuberc. 54:559 (1946).
39. Runyon, E. H.: Identificatio of Mycobacterial Pathogens utilizing Colony Characteristics. Am. J. Clin. Pathol. 54:578 (1970).

40. Schaefer, W. B., Cohn, M., et al.: The roles of biotin and carbon dioxide in the cultivation of Mycobacterium tuberculosis. J. Bacteriol. 69:706 (1970).
41. Sierra, G.: A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek 23:15 (1957).
42. Smith, W. H.: Modifications of Dubos's media for the cultivation of Mycobacterium johnei. J. Pathol. Bact. 66:375 (1953).
43. Stonebrink, B.: The use of a pyruvate containing egg medium in the culture of isoniazid resistant strains of Mycobacterium tuberculosis var. hominis. Acta Tuberc. Scand. 35:67 (1958).
44. Sumer, W. J., Cohn, S.: Sputum induction in patients with pulmonary tuberculosis by newer inhalation methods. Am. Rev. Resp. Dis. 94:502 (1966).

45. Tarshis, M. S., Kinsella, P. et al.: Blood media -
for the cultivation of Mycobacterium tuberculosis
J. Bact. 66:448 (1953).
46. Yegian, D. and Vandelande, R. J.: The nature of -
acid-fastness. J. Bact. 54:777 (1947).