

21
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"**

Nuevo Procedimiento Para Teñir al
Mycobacterium Tuberculosis

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
CATALINA ISLAS GUTIERREZ



México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1960



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 está 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.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCION.	1
- <u>La Tuberculosis pulmonar como problema de salud.</u>	1
- <u>Morbilidad y mortalidad.</u>	1
- <u>Relevancia económico-social.</u>	2
- <u>Morfología y fisiología.</u>	2
- <u>Composición química.</u>	3
- <u>Patogénesis.</u>	5
- <u>Inmunidad.</u>	7
- <u>Diagnóstico de Laboratorio.</u>	8
- <u>Acido-resistencia y tinción de M. tuberculosis.</u>	11
- <u>Historia de la tinción de ZIEHL-NEELSEN.</u>	13
- <u>Otras técnicas.</u>	15
II. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA.	17
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	20
IV. OBJETIVO.	21
V. HIPOTESIS.	21
VI. MATERIAL Y METODOS.	22
- <u>Material biológico.</u>	22

	Página
- <u>Material general.</u>	22
- <u>Colorantes.</u>	22
- <u>Reactivos.</u>	23
- <u>Metodología.</u>	23
VII. RESULTADOS.	29
VIII. DISCUSION DE RESULTADOS.	33
IX. CONCLUSIONES.	38
X. ANEXO.	39
- <u>Colección de muestras clínicas.</u>	39
- <u>Preparación de colorantes y soluciones.</u>	39
XI. BIBLIOGRAFIA.	42

I. INTRODUCCION

La tuberculosis pulmonar como problema de salud.

Todas aquellas organizaciones que luchan contra la tuberculosis están de acuerdo en calificar a esta enfermedad, como uno de los problemas de salud más importantes, sobre todo en los países cuyas condiciones económicas, sociales, sanitarias y culturales son semejantes a las que privan en la República Mexicana.

Lo anterior se puede apreciar con los últimos datos estadísticos aportados por la Dirección General de Bioestadística de la Secretaría de Salud (SS) en el año de 1975, en donde se dice que la tuberculosis ocupó el decimo primer lugar entre las causas de defunción, con tasa de 14.1 por cada 100,000 habitantes (1).

Morbilidad y mortalidad.

En 1976 se descubrieron 10 961 enfermos de tuberculosis pulmonar, lo que equivale a una tasa de morbilidad de 17.58 por cada 100 000 habitantes, ocupando el decimo sexto lugar entre las causas de morbilidad infecciosa en nuestro país.

El análisis de morbilidad en los últimos cuatro años, demuestra que no ha habido una disminución significativa en lo que respecta a la notificación de casos nuevos, tanto en la forma pulmonar, como en las variedades de tuberculosis extrapulmonar.

Según datos oficiales en relación con sujetos menores y mayores de 15 años (considerando los últimos 10 años en que se disponen de datos estadísticos), en ambos grupos la mortalidad por tuberculosis va en descenso pero predomina en los sujetos mayores de 15 años (1).

Relevancia económica-social.

La enfermedad tiene una gran trascendencia económica-social, pues to que ataca en la época más productiva de la vida, cuando el sujeto es jefe de familia o como en el caso de la mujer, cuando es indispensable para la actividad del hogar.

Es una enfermedad crónica que ocasiona daño orgánico por las lesiones pulmonares que produce (tuberculosis pulmonar) y psicológico, por la preocupación que para el enfermo implica el riesgo de transmitirla al medio familiar.

Morfología y fisiología.

El M. tuberculosis presenta una morfología bacilar de bastones delgados, algunas veces ligeramente curvos de 0.2 a 0.6 μ de diámetro y de 0.5 a 4 μ de largo (2, 3, 4, 5).

Las micobacterias se presentan aislados, pero a veces se observan en grupos pequeños y ocasionalmente como masas compactas, donde se pueden distinguir los bacilos individuales (2).

El bacilo de la tuberculosis no es móvil ni formador de esporas. En ocasiones se observan dentro de las células cuerpos pequeños, que se colorean intensamente y cuya presencia se ha interpretado en varias formas, pero se cree que sean acumulaciones de polifosfato.

A menudo se observan vacuolas de lípidos, que se tiñen intensamente con colorantes lipofílicos, e incluso le pueden dar el aspecto de una cadena de cocos a la célula teñida (2,6).

Es aerobio estricto y de crecimiento lento, ya que su tiempo más corto de generación es de 12 a 18 horas y no suele apreciarse crecimiento visible, aún en las mejores condiciones, antes de 15 días. Casi siempre son necesarias por lo menos tres semanas para que sea evidente el desarrollo, el cual se ve favorecido con un pH de 6 a 8 y con un rango de temperatura entre 30 y 42°C (óptima 37°C).

En el medio de cultivo suele formar colonias características de un color café-amarillento, rugosas, secas y de tipo eugónico o sea que llega a presentar un desarrollo exuberante.

Para estimular su crecimiento se puede añadir a los medios de cultivo ácidos grasos y para estudios cuantitativos se han introducido detergentes no iónicos, como el tween 80 que promueve crecimientos dispersos por la ruptura de la tensión superficial e interfacial del medio de cultivo líquido (2, 4, 5, 6).

Aunque puede crecer en los medios sintéticos más sencillos, es práctica común durante la elaboración diagnóstica utilizar un medio complejo como es el de Lowenstein-Jensen, pues resulta satisfactorio para realizar la mayoría de las investigaciones.

Composición química.

La composición química de las micobacterias ha sido la más estudiada de todas las bacterias, ya que son de particular interés por su alto contenido en lípidos, los cuales pueden constituir hasta el 60%

de la célula (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

Esta riqueza en lípidos probablemente pueda explicar las propiedades que caracterizan a estos microorganismos; por ejemplo la relativa impermeabilidad a los colorantes, la alcohol ácido resistencia, así como el ser refractario a la acción letal de ácidos y álcalis y tal vez a su crecimiento lento, etc. (2, 3, 6, 7).

Se ha comprobado que estos lípidos están compuestos principalmente de:

1. Fosfolípidos que incluyen la cardiolipina, fosfatidiletanolamina, fosfatidil-inositol, monofosfatidil-inósidos.

Los ácidos grasos constituyentes de estos fosfolípidos son de diversa índole; entre ellos se encuentran los bien conocidos ácidos palmítico, linoléico y linolénico, junto con los ácidos fítico y tuberculoesteárico, que son exclusivos de las micobacterias.

2. Los ácidos micólicos, una familia de los ácidos grasos α -alquil, β -hidroxil, forman una parte principal de los constituyentes de la pared celular y frecuentemente se encuentran esterificados con arabinosa.
3. Los glucolípidos son de naturaleza variable, incluyendo al factor cordón, el cual contiene ácido micólico (6, 6 dimicoloil-D-trehalosa), sulfolípidos y amino ácidos.

En lo que respecta a las respuestas tisulares y a las reacciones de sensibilidad la Cera D y el Factor cordón han sido los más estu-

diados.

De la primera se sabe que posee diversas actividades biológicas, de las cuales la más conocida es su comportamiento como adyuvante en la respuesta inmunológica e inducción del interferón; del segundo se sabe que está directamente relacionado con la virulencia, con la inducción del interferón y con la formación de anticuerpos protectores inespecíficos.

Otros componentes son los aminoácidos y los polisacáridos; éstos últimos se encuentran unidos químicamente a los lípidos.

La fracción polisacárida contiene polímeros de glucosa. Se ha sugerido que parte de la pared celular y la Cera D están incluidos en un complejo ácido micólico-arabinogalactan(2, 3, 4).

Todo lo anterior ha sido motivo de una búsqueda exhaustiva y una enorme serie de investigaciones, en las que prevalece el estudio casi exclusivo de las micobacterias pero, salvo aquellos casos en que han sido inoculados en algunas especies animales, al parecer se han descuidado y hasta olvidado los factores de resistencia de dichas especies lo cual tal vez podría ayudar a explicar muchos puntos oscuros que prevalecen en relación con este microorganismo tan especial.

Patogénesis.

La tuberculosis pulmonar es una enfermedad microbiana que es adquirida principalmente por la inhalación del bacilo de Koch, que proviene de individuos enfermos y bacilíferos. Se entiende por bacilíferos a aquellos que al toser, expectorar, estornudar, o al hablar elimi

nan y exhalan los microorganismos al ambiente (2, 3, 4, 7, 6, 5, 8).

Una vez que penetran al nuevo huésped, los bacilos crecen libremente, pero la mayoría son fagocitados por macrófagos alveolares.

Muchos de los macrófagos invadidos son destruidos debido al abundante crecimiento y a las actividades metabólicas del *Mycobacterium* en su interior.

Cuando esto sucede, los microorganismos liberados son nuevamente fagocitados por neutrófilos, (que por ser de vida breve, liberan por segunda ocasión al bacilo) o por macrófagos jóvenes que suelen emigrar a los ganglios linfáticos.

Como consecuencia, se origina histológicamente una respuesta de tipo exudativo, que consiste en una reacción inflamatoria aguda, con líquido de edema, leucocitos polimorfonucleares y monocitos alrededor del bacilo.

En este tipo de respuesta pueden ocurrir dos cosas; una, que las lesiones "curen", se clasifiquen y permanezcan inactivos toda la vida (Complejo de Ghon), y otra que evolucionen hacia un segundo tipo de lesión y produzcan una enfermedad mortal, sobre todo en lactantes, personas debilitadas o pertenecientes a razas de susceptibilidad innata (6, 9).

Después de la infección primaria puede haber una reactivación o una reinfección de la enfermedad, originándose entonces una respuesta de tipo productivo, la cual se caracteriza por la formación del tubérculo. Este es un granuloma que está formado, del centro a la periferia, por células gigantes, células epitelioides, macrófagos, linfocitos y

fibroblastos.

Como se mencionó anteriormente los macrófagos no pueden soportar el crecimiento abundante del *Mycobacterium* y por ello es que sufren la transformación a células epitelioides. Estas células poseen la capacidad de inhibir el crecimiento del microorganismo.

Al pasar el tiempo las células epitelioides mueren y ocasionan necrosis central del tubérculo (caseificación), inhibiéndose entonces el crecimiento del bacilo en esta área, pero continuando en la periferia del mismo.

Después de la caseificación viene la licuefacción debida en la mayoría de los casos, a infecciones secundarias por bacterias plógenas.

Cuando esto sucede se observa un crecimiento explosivo del bacilo, por la comunicación del material licuado con las vías aéreas superiores y por la presencia de oxígeno.

Esto ocasiona la aparición de tos intensa y por ende la diseminación del bacilo en forma de aerosol. La salida del material gaseoso origina la formación de una cavidad, la cual esta revestida por una cápsula fibrosa y constituye una barrera para la quimioterapia, más -- que para los mecanismos naturales de defensa (6).

Inmunidad.

Se ha comprobado que la respuesta de tipo celular desempeña un papel importante en la infección tuberculosa.

Esta inmunidad debe actuar tanto intra como extracelularmente. La

primera depende de la actividad del macrófago y la segunda, de las condiciones ambientales en el interior del tubérculo (6).

Como ya se mencionó, el primer paso para la formación del granuloma se inicia con la fagocitosis del microorganismo. Después, éstos son expuestos ante el linfocito T y éste a su vez responde con la proliferación y liberación de linfocinas, para que actúen sobre los macrófagos, desencadenando una serie de reacciones que culminan con el tubérculo.

La estimulación linfocítica constituye un suceso inmunológico específico. Sin embargo, los macrófagos son activados en forma inespecífica, pues son bactericidas tanto para el M. tuberculosis como para otras bacterias intracelulares.

El macrófago es pues, la célula encargada de la inmunidad y aunque no se conoce con certeza la manera por la cual se activa, se piensa que son las linfocinas las que actúan sobre los macrófagos para mantener un alto nivel de acción en el tubérculo (2, 6).

Diagnóstico de Laboratorio.

En la tuberculosis pulmonar las manifestaciones clínicas dependen del grado de avance de la enfermedad. Así tenemos que para establecer un diagnóstico al paciente con una lesión inicial, se requiere de una radiografía torácica y de una prueba positiva a la tuberculina, más que de un frotis o de un cultivo de la expectoración.

En cambio en las lesiones intermedias o avanzadas, en donde hay fiebre, caquexia, pérdida de peso, anemia, tos crónica y hemoptisis, el

estudio bacteriológico constituye una parte importante para la confirmación del diagnóstico clínico. En estos casos la demostración del bacilo en el frotis de expectoración, constituye una prueba confirmativa de que la enfermedad es tuberculosis.

Las preparaciones suelen teñirse con la técnica de Ziehl-Neelsen o por métodos de coloración fluorescentes (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

Cuando el material biológico no es expectoración el estudio bacteriológico implica el frotis, el cultivo, pruebas bioquímicas y la inoculación en animales susceptibles. Debido a que: 1) el cultivo puede permitir el desarrollo de algunos organismos que pudieron no haberse observado en el frotis teñido, ya que hay muestras que contienen pocos bacilos por ejem: LCR, Líquido Pleural, etc. ; 2) puede distinguirse entre bacilos tuberculosos y variedades avirulentas por ejemplo M. smegmatis de M. tuberculosis en tuberculosis renal (31); y (3) se puede estudiar la sensibilidad del fármaco antes de iniciar la quimioterapia (3).

Para el primocultivo son preferibles los medios sólidos que contienen yema de huevo y glicerol, pues estimula el crecimiento de las colonias hasta alcanzar tamaños macroscópicos. Las colonias características aparecen después de tres semanas de incubación (2, 3, 8).

Con el fin de favorecer el desarrollo del *Mycobacterium* y evitar que los contaminantes crezcan, se emplean las técnicas de concentración.

En éstas se aprovecha la extraordinaria resistencia del bacilo a los ácidos y alcalis; por ejemplo, en el método de Petroff, el material es homogeneizado con NaOH al 4%, luego se neutraliza con HCl y posteriormente se centrifuga. El concentrado es lavado con agua estéril (que contenga 100 UI/ml de penicilina) y del sedimento final se preparan, tanto los frotis como el cultivo (3).

Una vez obtenido el cultivo se realizan las pruebas bioquímicas, características fisiológicas y morfológicas, entre éstas las más útiles son las siguientes:

Pruebas morfológicas:

Forma de colonia Generalmente rugosa
 Pigmentación Color café-amarillo

Pruebas fisiológicas:

Desarrollo a 25° C Negativo

Pruebas Bioquímicas:

Producción de Niacina **Positiva**
 Inoculación en medio P.N.B. (Δ) No hay desarrollo
 Producción de catalasa Positiva, las cepas
 resistentes a la iso
 niacida son negativas
 Producción de peroxidasa Positiva, las cepas
 resistentes a la iso-
 niacida son negativas

(Δ) P.N.B. Medio Lowenstein - Jensen con ácido p-nitrobenzoico.

Rara vez es necesario o deseable recurrir a la inoculación de cobayos, pero cuando se lleva a cabo se inyecta en la ingle y se observa crecimiento de los ganglios entre 2 a 3 semanas (2), además se le practican pruebas cutáneas con tuberculina y, cuando la hipersensibilidad es evidente, se examinan las lesiones para demostrar la existencia del bacilo de Koch por medio de frotis (improntas) y cultivos (3).

Tinción y ácido-resistencia.

Los colorantes son sales en las que uno de sus iones tiene un color. Así, por ejemplo, el colorante azul de metileno, es la sal de cloruro de azul de metileno, que se disocia de la siguiente manera:



El color reside en el ión cargado positivamente, la célula cargada negativamente se combina con éste y debido a la diferencia de cargas se tiñe (4).

Basándose en lo anterior, los colorantes se pueden dividir en dos grupos: Ácidos, cuando el ión está cargado negativamente, por ejemplo, eosina y nigrosina. Básicos cuando el ión está cargado positivamente, como en el caso del cristal violeta o la fucsina (4).

La naturaleza catiónica de estos últimos es conferida por sus constituyentes amino y para formar complejos se ven favorecidas por sustancias acídicas (10).

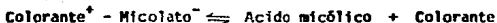
Los colorantes básicos arriba mencionados se diferencian en la proporción y grado en que tiñen una célula. El azul de metileno reacciona en menor proporción, tardando de 30 a 60 segundos en teñir bien

una preparación microbiana. El cristal violeta es más reactivo y necesita normalmente sólo 10 segundos. La fucsina fenicada es un colorante aún más potente y necesita sólo 6 segundos.

El ácido micólico juega un papel importante, tanto en la tinción como en la ácido-resistencia del M. tuberculosis, pues forma complejos estables al ácido con los tintes cristal violeta y fucsina, reteniendo los mediante enlaces iónicos y dando lugar a un complejo en forma de sal:



Sin embargo, se ha demostrado que este enlace es débil, ya que con los ácidos inorgánicos fuertes el complejo se disocia, dando ácido micólico libre y la sal del colorante. Esto es:



De acuerdo con Asselinum J. (11), el ácido micólico libre es capaz de formar complejos con el colorante. En cambio, la mayoría de los micolatos, los cuales se encuentran esterificados a la arabinosa de la pared celular y las variedades de cera D, son incapaces de formarlos.

No obstante, Goren, Cernich y Brokl (10) han reportado que la totalidad de los lípidos micobacterianos, incluyendo el ácido micólico complejo con el colorante, y especialmente las formas no ácido-resistentes esterificadas, como el mico101-arabinogalactana-mucopéptido, contribuyen a impedir la penetración del ácido decolorante y la pérdida de la ácido-resistencia puede ser debida a la carencia de este complejo

Por las características anteriormente citadas, estos microorganismos no pueden teñirse como las demás bacterias, con los métodos usuales, debido a la formación del complejo arriba mencionado y, además por su resistencia a la decoloración con ácidos es que son denominados Bacilos Acido-Alcohol Resistentes (BAAR).

Historia de la tinción de Ziehl-Neelsen.

La primera técnica para observar al M. tuberculosis fue publicada por Koch en 1822. En ella se aplicaba únicamente azul de metileno y como colorante de contraste vesuvina, la cual servía a su vez como decolorante.

Posteriormente, Ehrlich publica la primera modificación a la tinción de Koch, que consistía en la decoloración del bacilo por el ácido.

Durante el mismo año, la coloración de Ehrlich fue corregida por Ziehl y ésta a su vez por Rindfleish. Posteriormente Neelsen en 1883 combina la técnica de Ziehl con la de Ehrlich (12, 13).

Desde entonces han aparecido nuevos procedimientos de tinción de los BAAR, pues actualmente se disponen de más elementos, tanto de reactivos y colorantes, como de infomación que permiten realizarlos. sin embargo, ésto nos dá una idea de que los resultados no son del todo satisfactorios.

En la actualidad, la técnica de Ziehl-Neelsen es la más empleada en los laboratorios, aún cuando han sido ya varios los autores que rechazan al azul de metileno (colorante de contraste de la tinción de Ziehl-Neelsen); entre ellos tenemos a Kremer y Wiese (14), Bayona (15)

y Tamási (16). Todos ellos recomiendan no emplearlo pues en preparaciones gruesas tiñe demasiado, de tal manera que puede ocultar a los BAAR.

Por otro lado, ha sido persistente la confusión de las propiedades de la técnica de Gram en el bacilo. Diversas publicaciones especializadas en microbiología fracasan en señalar las características de tinción de estos microorganismos. Algunos reportan una leve Grampositividad (2, 4, 5, 6, 17, 18), y otros más señalan una Gram neutralidad (19).

En 1933 Kretschmer (18) fue de los primeros en informar la Grampositividad del bacilo, al estudiar los pasos de la tinción de Gram sobre las micobacterias.

Hizo varias coloraciones, utilizando cristal violeta y violeta de genciana disueltos en agua y en anilina y observó que el violeta de gen ciana en anilina penetraba mejor en el cuerpo de la bacteria.

Con respecto al yoduro (mordente de la tinción de Gram), el mismo autor informa que no tiene ninguna función sobre el bacilo y, por último, que persistía la ácido-resistencia del Mycobacterium con esta ténica.

Por lo anteriormente señalado, se han ensayado varios procedimientos de tinción para el M. tuberculosis, en los cuales se realizan los siguientes puntos:

1. Hallar una coloración que tiña más intensamente a los BAAR.
2. Encontrar la manera de teñir un mayor número de ellos.
3. Disminuir el tiempo de tinción.

4. Acortar el tiempo de búsqueda de los BAAR por campo microscópico.

Otras técnicas.

Existen diferentes técnicas para teñir el M. tuberculosis algunas poco conocidas como con la de Carbalho (20), Tamási (16) y Bayona (15). Y otras que son las empleadas actualmente, como con la de Ziehl-Neelsen (21), la de Kinyoun (22) y la tinción fluorescente (21).

En la de Carbalho y Tamási, se agrega un agente humectante (detergente), el cual rompe la polaridad y aumenta la afinidad o la penetración del colorante al soma bacteriano. Esto lo realizan a temperatura ambiente y por otro lado, cambian el colorante de contraste con el fin de que destaquen más los BAAR.

Bayona somete la preparación teñida a ebullición y también cambia el colorante de contraste. Kinyoun utiliza una carbolfucsina bastante concentrada, colorando al bacilo a temperatura ambiente.

La utilización del detergente tiene como desventaja el barrido del frotis por la acción del mismo, sobre todo cuando la preparación no está bien fijada.

La ebullición del colorante puede presentar dos problemas; primero romper la laminilla por el sobrecalentamiento y segundo, formar costras del colorante.

En la tinción fluorescente, el bacilo se tiñe a emisión de vapores con colorantes tales como la auramina o rodamina.

Este procedimiento, aunque es muy sensible no se lleva a cabo en

todos los laboratorios por requerir de un microscopio con una adaptación especial para luz U.V.

II. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

Para la tinción del M. tuberculosis, en el laboratorio se emplean los siguientes materiales biológicos: expectoración, contenido gástrico, exudado pleural, LCR, etc; y los procedimientos a los que se someten son: La baciloscopia, el cultivo de los mismo y su identificación mediante pruebas bioquímicas, así como la inoculación en animales susceptibles.

De todo lo mencionado, es la baciloscopia la que se realiza primordialmente por el corto tiempo que se emplea en ella (\pm 30 minutos) y por que es en primera instancia, la que suelen pedir los médicos. Además, hablando económicamente, es la menos costosa.

Las otras pruebas son bastante importantes para el diagnóstico, pero los inconvenientes que presentan son que, tanto la inoculación como el cultivo del producto, requieren de un mayor tiempo de desarrollo, para posteriormente realizar las pruebas bioquímicas.

De las diferentes vías de entrada del M. tuberculosis en el ser humano, es el pulmón el órgano más frecuentemente afectado por el bacilo (23). De ahí que este trabajo se base principalmente en el estudio de muestras de pacientes con tuberculosis pulmonar.

Los bacilos de la tuberculosis no son microorganismos comensales y aislarlos de expectoración es patognomónico de la enfermedad, ya que las micobacterias saprófitas rara vez se encuentran en las vías respira

torias; por esto, el hallazgo de un bacilo ácido-alcohol resistente en un frotis de expectoración teñido por el método de Ziehl-Neelsen, puede ser evidencia concluyente de tuberculosis (17).

La tinción con el colorante fluorescente de auramina es un método sensible, que en la actualidad se está utilizando mucho y proporciona un diagnóstico presuntivo, el cual se puede confirmar aplicando la coloración de Ziehl-Neelsen (17, 24).

Aquí la baciloscopia es de gran importancia, pues permite que la quimioterapia se inicia al instante, sin esperar el resultado del cultivo, el cual tarda varias semanas.

Recapitulando, se puede decir que por costumbre o por desconocimiento de otros procedimientos que puedan proporcionar mejores resultados, la tinción de Ziehl-Neelsen ha sido por mucho tiempo la técnica más empleada en los Laboratorios de Diagnóstico Clínico.

No obstante la técnica de Ziehl-Neelsen presenta algunas desventajas; por ejemplo, hace difícil y tardado encontrar las micobacterias, ya que el colorante de contraste azul de metileno, en preparaciones gruesas tiñe demasiado de tal manera que enmascara a los BAAR. Además la dificultad de poder teñirlos no se ha logrado vencer totalmente debido a que su contenido en grasas y ceras no es homogéneo.

Con el fin de mejorar la tinción y con esto aumentar el número de hallazgos en la preparación, se han publicado diferentes métodos en los que se cambian los colorante, se aplica calor o se agregan agentes hu-

mectantes.

Por lo anteriormente señalado es que se ha elegido este proyecto, esperando conseguir un método que nos permita un mejor hallazgo del M. tuberculosis en el frotis y así ayudar a la clínica en el logro de un diagnóstico temprano de la enfermedad.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis es una enfermedad que constituye un grave problema de salud pública en México. Por lo que resulta muy importante poder obtener un diagnóstico temprano de ella. Esto a veces resulta difícil en pacientes que son poco bacilíferos.

Aunque la bacterioscopia es el procedimiento más utilizado para ayudar al diagnóstico, éste no es tan fácil de realizar pues la bacteria posee características especiales que la hacen difícil de teñir, ya que contiene gran cantidad de lípidos que impiden la entrada de los colorantes.

Por lo mismo existen diversas tinciones para el M. tuberculosis; entre ellas tenemos la de Carbalho, Tamási, Bayona y Kinyoun, quienes de alguna manera han modificado la técnica de Ziehl-Neelsen, que es la más empleada en los laboratorios para el diagnóstico de los BAAR.

Estas coloraciones se llevarán a cabo en el Laboratorio Central de Análisis Clínicos de la ENEP-Zaragoza, mediante la aplicación y posterior comparación de cada una de ellas, en expectorações.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se elegirán los reactivos y colorantes que ayudarán a elaborar un nuevo procedimiento y así auxiliar a la clínica en el logro de un rápido y más efectivo diagnóstico de la tuberculosis.

IV. OBJETIVO

Encontrar un método de coloración sencillo y de alta sensibilidad, que supere a los procedimientos conocidos hasta ahora y que permita aumentar el hallazgo de las micobacterias en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar.

V. HIPOTESIS

La combinación de colorante primario y colorante de contraste ie. fucsina y azul de metileno, puede mejorarse con otras combinaciones ie. cristal violeta y acriflavina, que proporcionen mejor visibilidad de los BAAR, incluso sin la adición de agentes humectantes ni la aplicación de calor.

VI. MATERIAL Y METODOS

Material biológico.

Se usaron 27 expectoraciones positivas de M. tuberculosis obtenidas del Hospital General de Zona No. 25 del IMSS, del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y del Laboratorio Central de Tuberculosis y Enfermedades del Aparato Respiratorio de la Secretaría de Salud.

Material General.

- Mechero Fisher
- Asa y porta-asa bacteriológica calibrada (0.4 mm de ϕ).
- Soporte universal con rejilla de asbesto para teñir a emisión de vapores.
- Papel filtro comercial
- Frascos goteros color ambar
- Matraz aforado de 100 ml
- Vasos de precipitado de 500 ml
- Microscopio American Optical, modelo Micro-Star
- cámara fotográfica con adaptador

Colorantes.

- Fucsina básica
- Azul de metileno
- Verde de malaquita
- Azul de toluidina
- Safranina

Marcas.

- Técnica Química, S.A.
- Merck
- Sigma
- Sigma
- Sigma

- | | |
|-------------------|-------|
| - Acriflavina | Merck |
| - Cristal violeta | Sigma |

Reactivos.Marcas.

- | | |
|-----------------------|--------------------------|
| - Fenol | Baker |
| - Acido sulfúrico | Baker |
| - Alcohol del 96% | Baker |
| - Trietilenglicol | Glicoles de México, S.A. |
| - Tween 80 | Merck |
| - Oxalato de amonio | Técnica Química, S.A. |
| - Aceite de inmersión | Merck |

Metodología.

Normalmente, en un Laboratorio de Análisis Clínicos, para la búsqueda de BAAR en expectoración se hace sólo un frotis de la muestra y se tiñe con la técnica de Ziehl-Neelsen. Si ésta es positiva, se reporta como probable M. tuberculosis y se califica con cruces la cantidad de bacilos presentes, a menos de que se pida un cultivo.

Para la realización del trabajo, se emplearon 27 expectoraciones positivas de M. tuberculosis calificadas con tres cruces, obtenidas bajo condiciones adecuadas y proporcionadas por el Hospital General de Zona No. 25 del IMSS, por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y por el Laboratorio Central de Tuberculosis y Enfermedades del Aparato Respiratorio de la Secretaría de Salud.

Se realizaron varias preparaciones de cada una de ellas, calculan

do tener siempre la misma cantidad de bacilos; para ello las muestras se estuvieron agitando y mezclando convenientemente y se tomaron cantidades iguales con un asa calibrada (0.4 mm de \emptyset . 0.01 ml).

De esta manera se preparaba en forma casi simultánea, el número de laminillas que se fueran a ocupar al realizar las tinciones.

Una vez hechas, la primera se teñía con Ziehl-Neelsen, para tener un modelo de comparación de la visibilidad del bacilo, con respecto de las otras técnicas.

En cuanto a la intensidad de color y a la comparación de una mejor visibilidad de dichos gérmenes, que son las características principales en las que se basa este trabajo, se hizo un "jurado óptico"; varios compañeros y la autora de este trabajo calificaban con cruces los frotis observados.

Además de las tinciones con las que se iba a comparar el Ziehl-Neelsen, se trató de desarrollar otra técnica en la que se empleará el cristal violeta como colorante primario y esto se logró al utilizar diferentes disoluciones del mismo.

Durante el desarrollo del presente trabajo, se hicieron bastantes frotis más de los que vienen consignados en los cuadros. Partiendo de la experiencia necesaria para dominar cada una de las técnicas, hasta lograr un resultado satisfactorio en cada una de ellas.

No se aplicaron métodos de concentración a ninguna de las muestras, ni se realizaron tinciones fluorescentes, considerando que no en todos los laboratorios se cuenta con los elementos de seguridad ni con el equipo necesario para llevarlos a cabo.

Los frotis se colorearon por los siguientes métodos:

Tinción de Ziehl-Neelsen.

1. Fijar la preparación suavemente al calor
2. Teñir el frotis con carbofucsina por 5 minutos, calentando a emisión de vapores. No dejar hervir, ni permitir que se seque.
3. Enjuagar con agua
4. Decolorar con alcohol-ácido por 1 minuto
5. Enjuagar con agua
6. Contrastar con azul de metileno durante 30 segundos
7. Lavar con agua y secar al aire

Tinción de Bayona.

1. Fijar la preparación suavemente al calor
2. Cubrir la preparación con carbofucsina durante 2 minutos 30 segundos, calentándola hasta llevarla a ebullición, sin dejar secar la preparación. Dejar enfriar
3. Enjuagar con agua, y luego decolorar con alcohol-ácido por 1 minuto
4. Lavar con agua y contracolorar con acriflavina por 1 minuto
5. Lavar con agua y secar al aire

Tinción de Carbalho.

1. Cubrir la preparación fijada al calor con una solución acuosa de tween 80, durante 10 minutos
2. Lavar con agua y cubrir la preparación con una solución de carbofucsina de Ziehl-Neelsen durante 4 minutos, a temperatura ambiente
3. Escurrir la lámina y decolorar con alcohol-ácido hasta que deje de fluir color.

4. Lavar con agua
5. Cubrir la preparación con una solución acuosa de verde de malaquita durante 1 minuto
6. Lavar con agua y secar al aire

Tinción de Kinyoun.

1. Fijar la preparación suavemente al calor
2. Cubrir la preparación con la carbolfucsina de Kinyoun por 5 minutos a temperatura ambiente
3. Lavar con agua
4. Decolorar con alcohol-ácido por un minuto
5. Lavar con agua y contracolorar con azul de metileno por 30 segundos
6. Lavar con agua y secar al aire

Tinción de Tamási.

1. Fijar la preparación suavemente al calor
2. Cubrir el frotis con una solución de azul de toluidina en trietilenglicol por 15 minutos
3. Lavar con agua
4. Añadir el alcohol-ácido gota a gota hasta que deje de fluir color.
5. Lavar con agua
6. Contrastar con safranina
7. Lavar con agua y secar al aire

Sustitución de la fucsina por el cristal violeta en la técnica de Ziehl-Neelsen.

1. Realizar los mismos pasos que para la técnica de Ziehl-Neelsen, pero utilizando el cristal violeta fenolado como colorante primario.

Sustitución de la fucsina por el cristal violeta en la técnica de Bayona.

1. Realizar los mismos pasos que para la técnica de Bayona, pero utilizando el cristal violeta fenolado como colorante primario.

Sustitución de la fucsina por el cristal violeta en la técnica de Kinyoun.

1. Fijar la preparación suavemente al calor
2. Cubrir la preparación con la solución de cristal violeta concentrado por 5 minutos a temperatura ambiente
3. Seguir los mismos pasos que para la técnica de Kinyoun

Sustitución de la fucsina por el cristal violeta en la técnica de Carbalho.

1. Realizar los mismos pasos que para la técnica de Carbalho pero utilizando el cristal violeta fenolado como colorante primario.

Sustitución del azul de toluidina por el cristal violeta en la técnica de Tamási.

1. Realizar los mismos pasos que para la técnica de Tamási, pero utilizando el cristal violeta en trietilenglicol como colorante primario.

Tinción con cristal violeta acuoso (26)

1. Fijar la preparación suavemente al calor
2. Teñir el frotis con la solución de cristal violeta acuoso por 5, 10, 15, 20, 25 ó 30 minutos; a temperatura ambiente.
3. Enjuagar con agua

4. Decolorar con alcohol-ácido por 1 minuto.
5. Enjuagar con agua.
6. Contrastar con acriflavina por 1 minuto.
7. Lavar con agua y secar al aire.

Tinción con cristal violeta oxalatado (9)

1. Fijar la preparación suavemente al calor.
2. Teñir el frotis con la solución de cristal violeta oxalatado por 5, 10, 15, 20, 25 ó 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavar con agua.
4. Decolorar con alcohol-ácido por 1 minuto.
5. Contrastar con acriflavina por 1 minuto.
6. Lavar con agua y dejar secar al aire.

VII. RESULTADOS

De todos los frotis que fueron teñidos se obtuvieron los siguientes resultados:

Como es habitual, en la coloración de Ziehl-Neelsen se observaron los BAAR rojos y el contraste azul.

Con la tinción de Bayona, los bacilos se apreciaron de color rojo intenso, sobre todo ante el contraste amarillo, lográndose como consecuencia una visibilidad tan buena o mejor que en el Ziehl-Neelsen.

En el caso de la aplicación de la técnica de Ziehl-Neelsen a temperatura ambiente, los bacilos se observaron de un color rojo pálido ante un contraste azul dando con ello, una regular visibilidad. Lo mismo ocurre con las técnicas de Carbalho y Kinyoun, pero éstos ante un contraste verde y azul respectivamente.

Al comparar la técnica de Tamási con la Ziehl-Neelsen a temperatura ambiente, se apreció que la segunda brinda una mejor visibilidad, ya que en la primera los bacilos no se observaron. (Cuadro 1).

ZIEHL-NEELEN		BAYONA	CARBALHO	KINYOUN	TAMASI
Emisión de va-	Temp. amb.	Ebullición	Temp.amb.	Temp.amb.	Temp.amb.
XXX	XX	XXX	XX	XX	
XXX	XX				
XXX	XX				
XXX	XX				X

Las cruces indican lo siguiente:

- XXX** Buena visibilidad de los bacilos en los frotis observados.
XX Regular visibilidad de los bacilos en los frotis observados
X Mala visibilidad de los bacilos en los frotis observados.

En el Cuadro 2 se advierte que el colorante de contraste de la técnica de Bayona (acriflavina) es el que dá la mejor visibilidad del bacilo al aplicarlo en cualesquiera de las técnicas descritas, excepto en la de Tamási.

TINCION		COL. DE CONTRASTE	AZUL DE METILENO	VERDE DE MALAQUITA	ACRIFLAVINA	SAFRANINA
ZIEHL	EMISION DE VAPORES	XX	XX	XXX	X	
NEELSEN	TEMPERATURA AMBIENTE	XX	XX	XXX	X	
BAYONA		XX	XX	XXX	X	
CARBALHO		XX	XX	XXX	X	
KINYOUN		XX	XX	XXX	X	
TAMASI		X	X	X	X	

Notación: Igual que Cuadro 1.

Por otra parte en el Cuadro 3 evidencia que el cristal violeta dá tan buena visibilidad como la fucsina, en las técnicas donde se aplica calor. Así mismo, en las coloraciones realizadas a temperatura ambiente se observó que el cristal violeta dá una intensidad de color bastan-

te aceptable, mejorando notablemente la visibilidad del bacilo aún en la técnica de Tamási.

TINCIÓN \ COL. Tra	FUCSINA	AZUL DE TOLUIDINA	CRISTAL VIOLETA
ZIEHL-NEELSEN	XXX		XXX
BAYONA	XXX		XXX
CARBALHO	XX		XX
KINYOUN	XX		XX
TAMASI		X	XX

Notación: Igual que el Cuadro 1.

En el Cuadro 4 se aprecia que con todas las soluciones de cristal violeta se obtiene una buena visibilidad del Mycobacterium a partir de los 20 minutos de aplicado el colorante.

TINCIONES	ZIEHL-NEELSEN	CARBALHO	KINYOUN	TAMASI	COL. Tra. DE GPM.	COL. Tra. DE GPM.
\ SOL. DE CRISTAL VIOLETA	CRISTAL VIOLETA FENOLADO	CRISTAL VIOLETA - FENOLADO + TWEEN 80	CRISTAL VIOLETA CONC.	CRISTAL VIOLETA CON TRIS TILICIT COL.	CRISTAL VIOLETA ACUOSO	CRISTAL VIOLETA OVALADO
TIEMPO						
5'	XX	XX	XX	XX	XX	XX
10'	XX	XX	XX	XX	XX	XX
15'	XX	XX	XX	XX	XX	XX
20'	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
25'	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX
30'	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX	XXX

Notación: Igual al Cuadro 1.

Sin embargo, con dilución acuosa de cristal violeta al 0.6% la tinción del M. tuberculosis se logra en sólo 5 minutos, tiempo que fue suficiente para producir una buena visibilidad. Una igual intensidad de color se puede lograr con una dilución tan baja como 0.1% de cristal violeta, aunque ésta requiere cuando menos de 20 minutos de tinción Cuadro 5.

CONC. \ TIEMPO	0.1%	0.2 %	0.3 %	0.4 %	0.5 %	0.6%
5'	X X	X X	X X	X X	X X	X X X
10'	X X	X X	X X	X X	X X	X X X
15'	X X	X X	X X X	X X X	X X X	X X X
20'	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X
25'	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X
30'	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X

Notación: igual que el Cuadro 1.

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

En la tinción del M. tuberculosis la aplicación del calor, ya sea a emisión de vapores como en la técnica de Ziehl-Neelsen o a ebullición, como en la de Bayona, permite una mejor coloración de los BAAR.

La ebullición tiene la ventaja de teñir a los bacilos mucho mejor que a emisión de vapores. Esto tal vez es debido a que, al aumentar la temperatura las ceras de la pared celular bacteriana se reblandecen más, facilitándose la penetración del colorante de modo que el bacilo adquiere un color rojo intenso que lo hace destacar. Por esta razón, de las tinciones con las que se comparó el Ziehl-Neelsen, la de Bayona es la más efectiva. Otra ventaja de llevar a ebullición es que se acorta el tiempo de tinción.

No obstante, las altas temperaturas tienen la desventaja de inducir la formación de costras del colorante, que ocasionalmente pueden interferir en la lectura, pues son difíciles de eliminar, también se corre el riesgo de que el portaobjetos estalle por el calor excesivo.

De acuerdo con algunos autores, la adición de agentes humectantes o el empleo de colorantes concentrados, mejora la tinción y la visibilidad de los BAAR. Para verificar la conveniencia de utilizar tales recomendaciones, se trabajó con la carbolfucsina de Ziehl-Neelsen a temperatura ambiente, observándose lo siguiente:

En la tinción de Carbalho, la combinación del Tween 80 con carbolfucsina al parecer no es necesaria, ya que de todas maneras la carbol-

fucsina sola tiñe a los BAAR.

Algo parecido ocurre con el método de Kinyoun; en éste se utiliza una fucsina más concentrada que la acostumbrada, pero en ambas técnicas los bacilos se tiñen con la misma intensidad a temperatura ambiente (Cuadro 1).

Lo anterior se puede apreciar también posteriormente, cuando se utilizó el cristal violeta como colorante primario (Cuadro 3).

En este estudio la tinción de Tamási no funcionó a pesar de que se siguieron rigurosamente las indicaciones del autor en la preparación de los reactivos.

Las diferentes técnicas hablan de la importancia del colorante de contraste para una mejor visibilidad de M. tuberculosis; pues los colorantes de tonalidades oscuras tienden a enmascarar a los BAAR en las partes más gruesas del frotis, en donde suelen quedar atrapados entre células y mucosidad-cierto cantidad de ellos.

Esto se puede confirmar en el Cuadro 2, pues al utilizar un colorante de tonalidad clara (acriflavina) se facilita la observación y diferenciación de los bacilos, permitiéndo una mejor visibilidad de ellos (aún en las técnicas donde el colorante primario se utiliza a temperatura ambiente) y disminuyendo así el tiempo de búsqueda por campo microscópico.

Tomando como referencia que los colorantes primarios para teñir al M. tuberculosis son básicos, se utilizó el cristal violeta (colorante también básico y de fácil adquisición en cualquier laboratorio) para realizar la tinción del bacilo, sustituyéndolo por la fucsina y el

azul de toluidina que se emplean en las técnicas arriba mencionadas (Cuadro 3).

La sustitución de los colorante, dió buenos resultados tanto en las técnicas en donde se aplicó calor como en las que se realizaron a temperatura ambiente.

Aplicando calor al cristal violeta, los BAAR se colorearon tan bien o mejor que cuando se utilizó la fucsina. A temperatura ambiente, el cristal violeta dá la misma intensidad de color que la fucsina y es tos dos colorantes superaron al azul de toluidina en cuanto a la visibi lidad del bacilo.

El contraste utilizado en esta parte y en las observaciones subsi guientes, fué la acriflavina pues como ya se había mencionado lo claro del contraste permite una mejor visibili dad del bacilo.

Como las soluciones que se prepararon con cristal violeta colorea ron regularmente al bacilo a temperatura ambiente, se pensó en variar el tiempo de tinción y en utilizar el cristal violeta oxalato y el cristal violeta acuoso de la técnica de Gram, observándose que todas estas soluciones tiñen por igual a los BAAR (Cuadro 4). Esto es muy importante pues la tinción del M. tuberculosis con cristal violeta ha sido motivo de controversia en la literatura.

El mismo Cuadro 4 evidencia que es a los 20 minutos de coloración cuando hay una buena visibilidad del bacilo.

También se aprecia que el empleo de los agentes humectantes (Tween 80 y Trietilenglicol) no son necesarios, pues el cristal violeta

en agua tiñe con la misma intensidad. Lo mismo ocurre con el cristal violeta fenolado y el oxalatado.

El hecho de que el cristal violeta tiñera bien a los BAA8 es sorprendente, pues la bibliografía consultada reporta que los lípidos micobacterianos proveen al género de una barrera hidrofóbica que impide la penetración de soluciones acuosas.

Por lo mencionado anteriormente, y además por ser la solución más simple se siguió trabajando con el cristal violeta disuelto en agua, procediéndose a evaluar diversas concentraciones y distintos tiempos de tinción; de esta evaluación se concluye que la solución de cristal violeta al 0.6% permite teñir al bacilo en un tiempo mínimo de 5 minutos.

Estos resultados son muy importantes pues se logra una técnica más fácil para teñir al M. tuberculosis la cual se realiza a temperatura ambiente, en un tiempo de 5 minutos, empleando un colorante primario y de contraste diferentes a los utilizados comúnmente, y lo más importante que proporciona una buena visibilidad.

Como la utilización del cristal violeta para la tinción del bacilo podría ser puesta en duda por las razones arriba mencionadas, para verificar la validez de la técnica se llevaron a cabo frotis adicionales, por una parte con una cepa pura de S. aureus y por otra con la misma expectoración positiva.

Como se esperaba, la cepa de S. aureus, sólo tomó el color del contraste (amarillo) ya que las bacterias que no son bacilos de la tuberculosis no soportan la acción del alcohol-ácido; en cambio en la ex

pección, únicamente los bacilos se tiñeron de color violeta ya que todos los demás microorganismos contaminantes, que pudieran estar en los frotis, quedan confundidos con el contraste.

Esto confirma la validez de la técnica propuesta con cristal violeta disuelto en agua para observar e identificar el bacilo de la tuberculosis.

Es importante agregar, que cada tinción se repitió varias veces para confirmar la consistencia de los resultados aquí presentados.

IX. CONCLUSIONES

1. Este estudio dió la oportunidad de desarrollar una técnica para teñir a los BAAR, empleando cristal violeta disuelto en agua como colorante primario y a la acriflavina como colorante de contraste a temperatura ambiente.
2. En esta técnica, al aumentar la concentración de cristal violeta en solución acuosa (hasta 0.6%) se acorta el tiempo de tinción de 20 a 5 minutos.
3. Al contrastar con amarillo (acriflavina) no existe el riesgo de que los bacilos se oculten, como ocurre con los colorantes de tonalidades oscuras.
4. Así mismo el empleo de colorantes concentrados ie: tinción de Kinyoun, o de agentes humectantes ie: tinciones de Tamási y Carbalho no mejora la visibilidad del bacilo.
5. La sustitución del azul de toluidina por el cristal violeta en la técnica de Tamási mejora notablemente la visibilidad de los BAAR.
6. Todas las decoloraciones se hicieron con alcohol-ácido para evitar dudas acerca de que no fueran bacilos ácido-alcohol resistentes.

X. ANEXO

Colección de las muestras clínicas.

Es importante explicar e instruir al enfermo que debe de juntar la secreción bronquial que se produce con la tos, ya que la saliva o la secreción buconasal no son útiles.

Si el paciente expectora, se puede solicitar el primer esputo de la mañana que generalmente es el más abundante de bacilos. Debe proporcionársele un frasco estéril, de boca ancha con un buen cierre, ya sea de plástico o de vidrio.

Es conveniente que la muestra no sobrepase 1/4 del volumen del recipiente, para que no se tire al transportarse.

La muestra puede mantenerse hasta una semana en refrigeración.

Preparación de colorantes y soluciones.

1. Trietilenglicol al 1% en agua (solución A) azul de toluidina al 0.1% (aforándolo con la solución A).
2. Solución acuosa de verde de malaquita al 5%
3. Azul de metileno al 0.5% en agua destilada
4. Fucsina básica 0.3 g disuelta en 10 ml de etanol al 96% (solución B)
Fenol al 5% en agua destilada (solución C)
Mezclar la solución B con la solución C
5. Safranina al 0.5% en agua destilada

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

6. Disolver 1g de acriflavina en 1 ml de etanol al 96% y aforar a 100 ml con agua destilada.

7. Fucsina de Kinyoun.

Fucsina básica	4 g
Fenol	8 ml
Alcohol al 96%	20 ml
Agua destilada	100 ml

Disolver la fucsina en el alcohol y agregar lentamente el agua agitando al mismo tiempo. Derretir el fenol en un baño maría a 36°C y agregar 8 ml al colorante, utilizando para ello una pipeta con bulbo de goma.

8. Tween 80 al 10% en agua destilada.
9. Cristal violeta 10 g disueltos en 100 ml de etanol al 96% (solución D).

Oxalato de amonio, solución acuosa al 1% (solución E)
Mezclar 20 ml de la solución D y 80 ml de la solución E.

10. Solución de cristal violeta al 0.1% en agua destilada.
11. soluciones de cristal violeta desde 0.2 a 0.6% acuoso.

Sustitución de la fucsina por el cristal violeta.

12. Cristal violeta 0.3 g disuelto en 10 ml de etanol al 96% (solución A).

Fenol al 5% en agua destilada (solución B)

Mezclar la solución A con la solución B.

- | | |
|---------------------|--------|
| 13. Cristal violeta | 4 g |
| Fenol | 8 ml |
| Alcohol al 96% | 20 ml |
| Agua destilada | 100 ml |

Disolver el cristal violeta en el alcohol y agregar lentamente el agua agitando al mismo tiempo. Derretir el fenol en un baño maría a 36°C y agregar 8 ml al colorante, utilizando para ello una pipeta con bulbo de goma.

Sustitución del azul de toluidina por el cristal violeta.

14. Trietilenglicol al 1% en agua (solución A).

Cristal violeta al 0.1% aforándolo con la solución A.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. **PACHECO, C., OLVERA R., y HERRERA, M.:** Panorama epidemiológico de la tuberculosis en la República Mexicana. Sal. Pub. Méx. XII: 251-259, 1980.
2. **FREEMAN, B.:** Tratado de Microbiología de Burrows. 21a. ed., Ed. Interamericana, México. pp. 26-27, 685-711, 1984.
3. **DAVIS, B., DULBECCO, R.:** Tratado de microbiología 2da. ed., Ed. Salvat, Barcelona. pp. 868-864, 1980.
4. **PELCZAR, M., AND REID, R.:** Microbiología, 2da. ed. Ed. Castilla, España., pp. 59, 180, 1966.
5. **DELAAT, A.:** Microbiología, 2da. ed., Ed. Interamericana, México, pp. 220-229, 1983.
6. **MYRVIK, Q.:** Bacteriología y Micología Médica. 1ra. ed., Ed. Interamericana, México, pp. 332-350, 1977.
7. **CARPENTER, P.:** Microbiología 2da. ed., Ed. Interamericana, México, pp. 422-424, 1979.
8. **PTIATKIN, K., and DRIVOSHEIN, Y.:** Microbiología. 2da. ed., Ed. Mir, Moscú, pp. 493-505, 1981.
9. **JAWETZ, E.:** Manual de Microbiología Médica. 9a. ed., Ed. El Manual Moderno, México, pp. 211-216, 1981.
10. **GOREN, M., CERNICH, M., and BROKLI, O.:** Some observations on Mycobacterial acid-fastness. Am. Rev. Resp. Dis. 118: 151-154, 1978.
11. **ASSELINAU, J.:** The bacterial lipids. Holden Day San Francisco 26:255, 1966.
12. **BISHOP, P., and NEUMANN, G.:** The history of the Ziehl-Neelsen stain. Tubercle 51: 196-206, 1970.
13. **ALLEN, B., and HINKES, W.:** Koch stain for tubercle bacilli. Bull. Int. Union Tuberc. 57:194-196, 1982.
14. **KREMER, W. and WIESE, O.:** Bone and bone-joint tuberculosis, The Amer. Rev. of Tuberc. XLVII: 140-143, 1936.

15. **BAYONA, G.:** Modificación a la tinción del bacilo de Koch y su aplicación en la investigación de éste en los líquidos pleurales. *Rev. Med. Hosp. Gral. (Mex):* 27-81, 1947.
16. **TAMASI, G.:** Differential stain for micobacteria that does not require heat. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:311, 1981.
17. **ROSS, P., and HOLBROOK, W.:** *Microbiología dental y Clínica.* 1ra. ed. Ed. Científica PLM S.A. México, pp. 356-409, 1979.
18. **HINSON, J., BRADSHAW, R., and BOONER, S.:** Gram stain neutrality of *M. tuberculosis*. *Am. Rev. Resp. Dis.* 123: 365-366, 1982.
19. **KRETSCHMER, O.:** The gram property of the acid-fast of the tubercle bacillus. *J. Lab. Clin. Med.* 19:350-358, 1934.
20. **DE CARBALHO, L.:** Coloracao a frio dos bacilos da tuberculose. *A Fac. Odont. Univ. S. Paulo.* 13:33-38, 1955.
21. **ALLEN, B.:** *Micobacteria.* 2da. ed. Ed. El Manual Moderno, México. pp. 45-49, 1976.
22. **KINYOUN, :** A new method for tubercle bacilli stain. *Amer. J. Healt.* 5:473-475, 1915.
23. **KRUGMAN, S., WARD, R., and KATZ, L.:** *Enfermedades infecciosas.* 5a. ed. Ed. Interamericana, México, pp. 356-409, 1979.
24. **CHESBROUGH, M., and MC ARTHUR, J.:** *Manual para Hospitales Rurales en Zonas Tropicales.* 1ra. ed., Ed. CECSA? México, pp. 172, 1979.
25. **PACHECO, C.:** El Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. *Sal. Pub. Méx.* XX:33-41, 1978.
26. **LAWRENCE, G.:** Microbiology of tubercle bacilli. *Am. Rev. Resp. Dis.* 125:30-41, 1982.
27. **MUROHASHI, T., and KONDO, E.:** The role of lipids in acid fastness of *Micobacteria*. *Am. Rev. Resp. Dis.* 99:794-798, 1969.
28. **LILLIE, R.:** *Biological stains.* 9a. ed, Ed. The Williams and Wilkins Company, USA, pp. 273-276, 1977.
29. **QUENTIN, N.:** *Bacteriología y micología médica.* 1ra. ed, Ed. Interamericana, México, pp. 331-351, 1977.
30. **CALERO, J.:** *Microbiología e Inmunología de las enfermedades infecciosas.* 1ra. ed., Ed. Castilla S.A., Madrid., pp. 397-406, 1976.
31. **GARCIA, R.:** *PARRA, M.:* *Manual para Aislamiento e Identificación de M. tuberculosis y otras Micobacterias.* 2da ed., Ed. IPN, México, pp. 5-12, 1976.