



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

93

24

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

"EVALUACION DEL METODO RADIOMETRICO
(BACTEC) PARA PRIMOAISLAMIENTO,
IDENTIFICACION Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD
ANTIMICROBIANA DE Mycobacterium tuberculosis
AISLADOS DE MUESTRAS CLINICAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

NORMA ANGELICA RAMIREZ FERNANDEZ



MEXICO, D. F.

ABRIL 1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof. María del Carmen Cortés Decuir
Vocal	Prof. Miriam Bobadilla del Valle
Secretario	Prof. Raúl Garza Velasco
1er. suplente	Prof. Abel Gutiérrez Ramos
2do. suplente	Prof. Misael González Ibarra

Sitio de desarrollo del proyecto de tesis:

Laboratorio de Microbiología Clínica, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"
(INNSZ).

ASESOR DEL TEMA

Miriam Bobadilla del Valle.

M. en B. Miriam Bobadilla del Valle

SUSTENTANTE



Pas. Q.F.B. Norma Angélica
Ramírez Fernández.

*A Dios... gracias
Señor por estar
siempre a mi lado.*

*A mi mamá, por enseñarme que
no hay "nada" imposible, que todo
se logra si se intenta; por el amor
con que has formado esta familia,
por tus noches de desvelo y tu vida
dedicada a nosotros.*

*A mi papá, porque en ti tengo el
mejor ejemplo de superación, de
responsabilidad y amor al trabajo.
por compartir conmigo la idea de
que la ambición de ser mejores, nos
mueve a realizar nuestros propósitos.*

*A Clau, mi hermana y amiga,
porque juntas hemos
compartido muchas cosas,
porque he seguido tus pasos y
tu siempre me has tendido la
mano.*

*A Ale, gracias a ti, mi niñez
estuvo llena de felicidad,
ilusiones y travesuras que
siempre recordaré.*

*A Anita, por tu ternura y
rebeldeía, porque quiero
ayudarte a externar toda tu
capacidad en tu vida
profesional.*

*A Maru, mi "hermanita", por tu
increíble madurez, por tus
consejos y regaños y por
compartir conmigo tu alegría de
vivir.*

*A Roberto, porque tu presencia se ha
vuelto indispensable en mi vida. Gracias
por compartir conmigo el mejor y más
hermoso de los sentimientos...*

Agradezco de manera especial a:

M. en B. Miriam Bobadilla del Valle.

L. en C. Alfredo Peña de la Vega.

Inf. Alfredo Ponce de León.

Q.F.B. Raúl Garza Velasco.

Q.F.B. María del Carmen Cortés Decuir.

Q.B.P. Antonio Castillo Durán.

Q.F.B. Consuelo Ontiveros.

Inf. José Sifuentes O.

**En general a todo el personal del laboratorio de Microbiología Clínica del
INNSZ: Químicos, biólogos, médicos.**

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	4
2.1 Taxonomía micobacteriana.....	4
2.2 Generalidades.....	11
2.2.1 Características.....	11
2.2.2. Procesamiento de la muestra.....	11
2.2.3 Medios de cultivo.....	12
2.2.4 Identificación.....	12
2.3 Pruebas de sensibilidad.....	13
2.3.1 Método de las proporciones.....	15
2.3.1.1 Método original.....	15
2.3.1.2 Método de las proporciones versión CDC.....	16
2.3.1.3 Método de las proporciones versión disco.....	16
2.3.1.4 Método de las proporciones modificado.....	16
2.3.2 Método rango de resistencia (RR).....	17
2.3.3 Método de la concentración absoluta.....	17
2.3.4 Método radiométrico, automatizado (BACTEC).....	18
2.3.4.1 Principios generales.....	18
2.3.4.2 Pruebas cualitativas de sensibilidad mediante el sistema radiométrico.....	19
2.3.4.3 Pruebas cuantitativas de sensibilidad mediante el método radiométrico.....	19
2.4 Patología.....	19
2.5 Inmunología.....	23
2.6 Tratamiento.....	23
2.7 Epidemiología.....	28
2.7.1 Tuberculosis mundial.....	28
2.7.2 Tuberculosis en México.....	29
3. Justificación.....	32
4. Objetivos.....	32
4.1 General.....	32
4.2 Específicos.....	32
5. Hipótesis.....	33
5.1 Alterna.....	33
5.2 Nula.....	33
6. Materiales.....	34
6.1 Cepas bacterianas.....	34
6.2 Material de laboratorio.....	34
6.3 Equipo de laboratorio.....	34
6.4 Reactivos.....	35
6.5 Medios de cultivo.....	35
6.6 Antibióticos.....	35
6.6.1 Liofilizados de Becton-Dickinson.....	35
6.6.2 Sales Puras.....	35
6.6.3 Sensidiscos BBL.....	36

7. Métodos	37
7.1 Descontaminación y cultivo de muestras clínicas	37
7.2 Aislamiento de <i>M. tuberculosis</i> a partir de muestras clínicas	39
7.2.1 Medio de LJ.....	39
7.2.2 Medio 12B.....	39
7.3 Identificación	40
7.3.1 Pruebas bioquímicas.....	40
7.3.2 Método radiométrico.....	40
7.3.2.1 Interpretación.....	41
7.3.2.2 Control de calidad.....	41
7.3.2.3 Limitaciones.....	41
7.4 Sensibilidad	42
7.4.1 Método de elución con disco.....	42
7.4.1.1 Preparación del medio.....	43
7.4.1.2 Preparación del inóculo.....	43
7.4.1.3 Cálculo de resultados.....	43
7.4.1.4 Interpretación.....	44
7.4.1.5 Control de Calidad.....	44
7.4.1.6 Limitaciones.....	44
7.4.2 Método radiométrico.....	45
7.4.2.1 Preparación de soluciones madre de antibióticos.....	45
7.4.2.2 Preparación del inóculo.....	46
7.4.2.3 Interpretación.....	47
7.4.2.4 Control de calidad.....	47
7.4.2.5 Limitaciones.....	47
7.5 Análisis estadístico	48
8. Resultados	49
9. Discusión	63
10. Conclusiones	72
11. Bibliografía	73

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una infección bacteriana producida por microorganismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum*). Es transmitida a través del aire principalmente, por gotas de saliva excretadas por individuos con infección pulmonar. Estos son fuentes primordialmente infectantes cuando expectoran suficientes bacilos como para ser detectados en una tinción a partir de una muestra de expectoración (4).

La enfermedad es un problema de salud mundial muy grave. Se considera que una quinta parte de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis*, causa alrededor de 8 millones de casos nuevos y 3 millones de muertes, anualmente (91). Las estadísticas muestran que en muchas ciudades las medidas de control de la transmisión han sido ineficaces (63). La mayoría de los casos se presentan en países en vías de desarrollo, en los cuales el acceso a las instituciones de salud es limitado, en estos países existe desnutrición y la tuberculosis coexiste con otras enfermedades. El número de casos ha aumentado en un 18.4% a partir de 1985, debido en parte, a la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (11,81,91). Hasta 1989, la mayoría de los aislados eran sensibles y menos de 8% presentaba resistencia a alguno de los antibióticos de primera línea (11). Los casos reportados de tuberculosis a los centros de control de enfermedades (CDC) durante los 3 primeros meses de 1991 indican que 13% de los casos nuevos son resistentes a por lo menos un antibiótico (11), informando brotes producidos por cepas multirresistentes entre personas infectadas con VIH, en las cuales la resistencia a isoniácida y a rifampicina son más comunes (59,81), ya que 3.2% de los casos presentan resistencia a ambos antibióticos. La mortalidad asociada en estos brotes de multirresistencia es de un 72% a 89% (11).

El diagnóstico definitivo de tuberculosis depende del aislamiento e identificación de *M. tuberculosis* en muestras clínicas. El tratamiento apropiado se basa en los resultados de pruebas de sensibilidad *in vitro*. Esta información ofrece una garantía para el control de la infección ya que la tasa de curación en enfermos con aislados sensibles es mayor a 95% si el tratamiento es completo. Sin embargo, en países en vías de desarrollo, como México el diagnóstico generalmente se basa en el resultado de la tinción de Ziehl-Nielsen (Z-N). Son muy pocos los laboratorios donde se realizan el aislamiento, la identificación y las pruebas de sensibilidad, entre estos se encuentran los laboratorios de referencia.

Para el primoaislamiento se utilizan básicamente medios de cultivo sólidos como Lowestein-Jensen (LJ), Middlebrook 7H10 (M7H10), Middlebrook 7H11 (M7H11), que requieren periodos de incubación de 3 a 8 semanas; por otro lado se requieren de 4 a 5 semanas más para la identificación y otros 21 días para la determinación de sensibilidad mediante el método de las proporciones con disco (24,69,85), cuya principal ventaja consiste en no esperar el crecimiento de la micobacteria para hacer la prueba, lo que reduce el tiempo para realizarla. Sin embargo, el problema es el tiempo de incubación para el desarrollo del microorganismo y, por consiguiente, la posibilidad de disminuir la potencia del antibiótico, produciendo resultados falsos.

Así mismo, debido al tiempo prolongado de incubación para el aislamiento temprano de *M. tuberculosis* y la determinación de su sensibilidad, se han creado métodos nuevos que permiten un periodo de incubación menor. En 1975 se describió el método radiométrico (5,12,65,77), el cual se basa en la detección de $^{14}\text{CO}_2$ producido durante el metabolismo micobacteriano del ^{14}C -ác. palmítico presente en el medio de cultivo líquido. La medición de la producción del gas se realiza con el sistema

radiométrico BACTEC TB 460 reduciendo el tiempo de recuperación de 2 a 40 días y el de sensibilidad de 4 a 12 días (33,42,55,68,69,81).

Este sistema cuenta también, con una prueba para la diferenciación del complejo *M. tuberculosis* de otras especies mediante el uso de p-nitro- α -acetilamino- β -hidróxiopropiofenona (NAP), un precursor de la síntesis de cloranfenicol, que inhibe el crecimiento del complejo *M. tuberculosis* en tanto que otras especies no son inhibidas. Este método requiere de 2 a 5 días de incubación (26) y no es independiente de los métodos convencionales de identificación.

El presente estudio se realizó con la finalidad de comparar la rapidez en el aislamiento de micobacterias a partir de una muestra clínica; la capacidad en la diferenciación rápida de *M. tuberculosis* del resto de las especies de micobacterias, la habilidad para determinar la sensibilidad antimicrobiana del método radiométrico y del método por elución de disco.

2. ANTECEDENTES

2.1 TAXONOMÍA MICOBACTERIANA

La identificación de micobacterias, comenzó a finales de 1800, con el descubrimiento del bacilo tuberculoso (originalmente llamado *Bacterium tuberculosis*) (96) y del bacilo leproso (originalmente llamado *Bacillus leprae*) (30), la clasificación de micobacterias comenzó en 1896 cuando Lehmann y Neumann (51) propusieron el género *Mycobacterium* para incluir esas especies (renombradas entonces como *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*) y la familia *Mycobacteriaceae*, orden *Actinomycetales* y clase *Actinomycetes*. (*Mycobacterium* es actualmente el único miembro en la familia *Mycobacteriaceae*, se ha propuesto incluir a *Nocardia* y *Rhodococcus* en esta familia [17]). La clasificación está basada en una o más características o patrones de caracteres los cuales tienen todos los miembros de este grupo. A finales del siglo (51), se determinaron las características que definían al género *Mycobacterium*, las cuales eran:

- 1) Morfología (bacilos inmóviles, no esporulados) y
- 2) Resistencia a alcohol-ácido (resistencia a la decoloración por alcohol acidificado cuando se tiñen con carbol fucsina).

Con esto era difícil distinguir a los miembros del género *Mycobacterium* de otros géneros relacionados como *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium*. Debido a esto, se desarrollaron algunos criterios para la diferenciación de este género, incluyendo la tinción de Gram, el rango de crecimiento, la resistencia a penicilina, el porcentaje de Guanina+Citosina, las cadenas de ácidos micólicos y la producción de arilsulfatasa (88). Actualmente, los estándares mismos para incluir una especie en el género *Mycobacterium* son:

1) resistencia a la decoloración con alcohol ácido,

2) la presencia de ácidos micólicos de 60-90 carbonos los cuales están clavados al C22 y al C26 de los ácidos grasos metilésteres por pirólisis y

3) un porcentaje G+C de 61-71 % (52).

En la actualidad se reconocen 71 especies propuestas incluidas en el género *Mycobacterium* (tabla 1). Estas especies están agrupadas usualmente en dos grandes divisiones, "crecimiento rápido" y "crecimiento lento", basado en el tiempo requerido para visualizar las colonias que aparecen en el medio sólido después de sembrar una suspensión diluida para obtener colonias bien separadas. La aparición de colonias requiere menos de 7 días para las especies de crecimiento rápido y más de 7 días para las especies de crecimiento lento. A su vez, las especies de crecimiento lento han sido divididas en tres grupos basados en la pigmentación (64,82): fotocromógenas (grupo I de Runyon), escotocromógenas (grupo II de Runyon) y no cromógenas (grupo III de Runyon). Esas divisiones no tienen taxonomía formal pero son muy usuales clínicamente y en esquemas de identificación. Por ejemplo, las especies de crecimiento lento generalmente pueden causar enfermedad en humanos y animales, mientras que las especies de crecimiento rápido no lo hacen, a su vez hay algunas excepciones significativas (21,31). Debe tenerse presente, sin embargo, que para los individuos inmunocomprometidos, las micobacterias no patógenas no deben estar presentes (19,21,31,36,90).

Las especies son también definidas por características similares y únicas y por convención internacional, la descripción de una especie debe incluir una lista completa de sus propiedades, especialmente de aquellas que son similares y que lo distinguen de especies relacionadas (46). Para profundizar en la definición de las especies el Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana recomienda establecer estándares mínimos para clasificación. Los estándares mínimos han sido

propuestos para las especies de crecimiento lento (52), pero todavía no para las especies de *Mycobacterium* de crecimiento rápido. Las pruebas comúnmente usadas para diferenciar las especies de *Mycobacterium*, se listan en la tabla 2. La descripción extensa y detallada para investigaciones taxonómicas no es necesaria para diagnósticos de rutina en laboratorios y muchas veces, es suficiente identificar un aislado como miembro de un grupo o complejo de una especie parecida. Funcionalmente, un "complejo" es definido con dos o más especies que se diferencian muy poco sin tener importancia médica, por ejemplo, la tuberculosis pulmonar causada por *Mycobacterium africanum* es tratada de la misma forma que la tuberculosis pulmonar causada por *Mycobacterium tuberculosis*, esto es suficiente para identificar el agente causal de tuberculosis pulmonar como un miembro del complejo *M. tuberculosis* (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. tuberculosis*). Aún así, es necesaria la identificación de un miembro de un complejo a nivel de especie o subespecie ya que tiene importancia epidemiológica e implicaciones de salud pública para determinar la patogenicidad y facilidad de transmisión de una especie. Generalmente, la clasificación de las especies se realiza de acuerdo a sus patrones mostrados de reactividad en la gran batería de pruebas bioquímicas que concuerden con una o dos propiedades (22). Por otro lado, como el número de cepas, especies y propiedades incrementa, la gran cantidad de información fenotípica llega a ser más difícil de asimilar para identificar la especie. Para facilitar el análisis de esta información, fue establecido en 1967, un Grupo Internacional de Trabajo en Taxonomía Micobacteriana (GITTM) para coordinar las técnicas y tinciones que se usaban, fue entonces cuando los investigadores comenzaron a utilizar un esquema de clasificación Adansoniana conocido como taxonomía numérica (89). En este sistema, a cada propiedad o característica de una cepa se le asigna un peso igual y se agrupa de acuerdo a sus

extensas propiedades compartidas. La limitación de la taxonomía numérica es que las características fenotípicas similares no necesariamente reflejan relación genética.

TABLA 1 Especies micobacterianas

Crecimiento lento		Crecimiento rápido	
Patógenas:	<i>M. shimoidei</i>	Patógenas:	<i>M. flavescens</i>
<i>M. africanum</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. gadium</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. gilvum</i>
<i>M. avium</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. komossense</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. madagascariense</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. methylovorum</i>
<i>M. farcinogenes</i>		<i>M. senegalense</i>	<i>M. moriokaense</i>
<i>M. genavense</i>	Saprófitas:		<i>M. neoaurum</i>
<i>M. haemophilum</i>	<i>M. cookii</i>	Saprófitas:	<i>M. obuense</i>
<i>M. interjectum</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. agri</i>	<i>M. parafortuitum</i>
<i>M. intermedium</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. aichiense</i>	<i>M. phlei</i>
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. hiberniae</i>	<i>M. alvei</i>	<i>M. poriferae</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. pulveris</i>
<i>M. leprae</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. austoafricanum</i>	<i>M. rhodesiae</i>
<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. triviale</i>	<i>M. brumae</i>	<i>M. shanghaiense</i>
<i>M. malmoense</i>		<i>M. chitae</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. marinum</i>		<i>M. chubuense</i>	<i>M. shagni</i>
<i>M. microti</i>		<i>M. confluentis</i>	<i>M. thermoresistibili</i>
<i>M. paratuberculosis</i>		<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. tokaiense</i>
<i>M. scrofulaceum</i>		<i>M. divalii</i>	<i>M. vaccae</i>
		<i>M. fallax</i>	<i>M. yunnanense</i>

Históricamente, la relación genética entre bacterias ha sido medida mediante técnicas de hibridación de DNA-DNA, con estas, las cepas con más de 70% de hibridación, son consideradas como miembros de la misma especie (86). Sin embargo, solo unas cuantas cepas de un pequeño número de especies han sido analizadas de esta manera ya que se requiere mucho esfuerzo.

Recientemente, los análisis de semántides (información molecular como de los ácidos nucleicos), se han usado para sondear la relación genética de las bacterias. Por ejemplo, la reacción cruzada de catalasa se ha usado como una medida de relación genética entre micobacterias (87) y las secuencias nucleotídicas de RNA ribosomal, se han usado extensamente para construir árboles filogenéticos (17,76,92).

Las principales especies que conforman cada grupo, se encuentran a continuación:

Especies de crecimiento lento:

El grupo III de Runyon, está compuesto por especies no cromógenas de *Mycobacterium*, incluyendo el complejo *M. tuberculosis*, el complejo *M. avium-intracellulare*, *M. celatum*, *M. gastri*, entre otros. La mayoría de estos, son patógenos en humanos y/o animales e incluyen las especies más frecuentes aisladas en los laboratorios de micobacteriología (20).

A este grupo pertenecen las especies del complejo *M. tuberculosis* que son las principales causantes de tuberculosis, una enfermedad que ha estado presente desde la prehistoria y aún causa millones de muertes anualmente. El complejo *M. tuberculosis*, formado por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti* son patógenos en el hombre y en animales a excepción del último que solo es patógeno en animales. De hecho, una cepa de *M. microti* y el BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), una cepa de *M. bovis*, se han usado como vacunas para prevenir la tuberculosis en humanos.

Especies fotocromógenas de lento crecimiento:

El grupo I de Runyon está formado por especies fotocromógenas de crecimiento lento del género *Mycobacterium* (*M. kansasii*, *M. asiaticum*, *M. marinum*, *M. intermedium*). Estas se pueden incluir dentro de este grupo debido a su capacidad para producir pigmento amarillento en presencia de luz.

Especies escotocromógenas de crecimiento lento:

Estas se encuentran en el grupo II de Runyon, está formado por especies escotocromógenas, es decir, las que son capaces de producir pigmento de amarillo a naranja tanto en presencia como en ausencia de luz y son algunas patógenas como *M. szulgai*, *M. scrofulaceum*, *M. farcinogenes* y no patógenas como *M. gordonae*, *M.- cookii*, *M. hiberniae*.

Especies de crecimiento rápido:

La mayoría de las enfermedades en humanos, es causada por las especies de micobacterias de rápido crecimiento de las miembros del complejo *M. fortuitum* (21). Los miembros comúnmente encontrados del complejo *M. fortuitum*, son: *M. fortuitum* subespecie *acetamidolyticum*, *M. fortuitum* subespecie biovar 3, *M. peregrinum*, *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. chelonae-like*.

Especies no cultivables *in vitro*

Mycobacterium leprae es el agente causal de la enfermedad de Hansen (18). Aún se desconocen sus reacciones bioquímicas y su status taxonómico ya que no ha sido posible cultivarlo *in vitro*. La identificación de *M. leprae* se basa usualmente en la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en una lesión de piel con características histopatológicas. Específicamente anticuerpos, sondas de ácido nucleico y amplificación de genes son algunas pruebas disponibles para diagnosticar la enfermedad de Hansen y *M. leprae*.

Tabla 2. Pruebas para clasificación de micobacterias

Especies de crecimiento lento	Especies de crecimiento rápido.
Crec. a 25°C, 30°C, 33°C, 37°C, 42°C, 45°C.	Crecimiento a 30°C, 37°C, 42°C, 45°C 52°C
Pigmentación	Pigmentación
Resistencia a:	Resistencia a:
1 µg/ml de isoniacida	500µg/ml de hidroxilamina
10µg/ml de isoniacida	5% de cloruro de sodio
1µg/ml de hidracida del ác. tiofeno-2-carboxílico	0.2% de picrato
500µg/ml de hidroxilamina	0.01% de verde de malaquita
500 µg/ml de ác. p-nitrobenzónico	0.01% de pironina B
5% de cloruro de sodio	Agar Mc Conkey
1 mg/ml de tiacetazona	Actividades:
0.2% de picrato	Toma de hierro
250 µg/ml de oleato	Fosfatasa ácida
Actividades:	Arilsulfatasa de 3 o 10 días
Catalasa resistente al calor	α-esterasa
Hidrólisis de Tween 80	β-esterasa
Ureasa	β-galactosidasa
Producción de niacina	Degradación de p-aminosalicilato
Nitrato reductasa	Acetamidasa
Fosfatasa ácida	Isonicotinamidasa
Arilsulfatasa de 3 días	Alantoinamidasa
Arilsulfatasa de 10 días	Succinamidasa
Pirazinamidasa	Benzamidasa
α-estearas	Acidificación de L-arabinosa, xylosa o dulcitol
β-estearas	Utilización de xilosa, oxalato y citrato
β-galactosidasa	sorbitol, manitol o trehalosa
Perfil de ácidos micólicos	Perfil de ácidos micólicos
Pirólisis de ácidos micólicos	Pirólisis de ácidos micólicos
Análisis de hibridación de DNA-DNA	Análisis de hibridación de DNA-DNA
Secuencia de RNAr 16S	Secuencia de RNAr 16S

2.2 GENERALIDADES

2.2.1 Características

Las micobacterias son microorganismos ácido-alcohol resistentes, aerobios, no esporulados, inmóviles, son bacilos ligeramente curvos que miden 0.2 a 0.6 por 1.0 a 4.0 μm , no tienen agrupaciones características aunque se pueden observar en acúmulos llamados cordones, a esta agrupación se le conoce como factor "core" (45). Desarrollan bien a 37°C y aunque son aerobios, se ha visto que a una tensión atmosférica de CO_2 al 5% durante las primeras semanas de incubación, desarrollan mejor (66). Tienen pared celular rica en lípidos, lo cual les permite teñirse por colorantes carbol-fucsina aunque pueden captar el cristal violeta en la tinción de Gram (66).

En general, el rango de crecimiento de las micobacterias es lento, va de 2 a 8 semanas o más para ser detectado en medios convencionales (45). Sin embargo pueden ser detectados más rápido usando el método radiométrico el cual se basa en la medición de $^{14}\text{CO}_2$ como metabolito producido por la micobacteria a partir de la fuente de carbono que es ^{14}C -ác. palmítico (24,69,85).

2.2.2 Procesamiento de la muestra

Comparada con otros tipos de bacterias, las cuales generalmente desarrollan en corto tiempo, las micobacterias son microorganismos de lento crecimiento (con un tiempo de generación de 18 a 24 h). Si las muestras provenientes de sitios no estériles del cuerpo, no son descontaminadas, es decir, dejar solo a las micobacterias, si las hay, estas tardarían aún más tiempo en desarrollar. Por esto, se han creado métodos diferentes de digestión-descontaminación, como son con N-acetil-l-cisteína/NaOH, dodecilsulfato de sodio/NaOH, Zefirán-fosfato trisódico (Z-TSP) principalmente (93).

2.2.3 Medios de cultivo

Para la detección de la mayoría de los cultivos positivos de micobacterias, se recomienda usar una combinación de medios de cultivos, tanto selectivos como no selectivos, entre los cuales los tenemos con base de agar como el Middlebrook 7H10/7H11, con base de huevo como el Lowenstein-Jensen y medios líquidos como el caldo Dubos, Septi-Chek y Bactec 12B (93)

2.2.4 Identificación

Morfología micobacteriana. Las colonias micobacterianas desarrolladas en medio a base de agar, son generalmente pequeñas, blanquizas y secas o cremosas dependiendo de la especie.

Sondas de ácidos nucleicos. La confirmación de los cultivos usando las sondas de DNA, se puede realizar para *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. goodii*, *M. kansasii* y las especies del complejo *M. tuberculosis*. Para esta última, el sistema Accu-Probe, tiene una precisión de casi 100% (13,50).

Prueba de NAP. El p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona, es un precursor en la síntesis del cloranfenicol e inhibe específicamente las especies del complejo *M. tuberculosis* mientras que el resto de las especies no son afectadas (55). Esta prueba puede realizarse radiométricamente como una identificación en menos de 5 días. El resultado de esta prueba debe considerarse preliminar ya que se han reportado de 2 a 3% de resultados falsos (28).

Cromatografía. Las diferencias cualitativas y cuantitativas en el espectro de los ácidos micólicos contenidos en la pared celular de las micobacterias, es sumamente útil para la identificación de las especies. Una vez que se tiene el desarrollo de la micobacteria en el medio de cultivo, se puede realizar la cromatografía líquida de alta presión la cual ofrece una identificación fácil y rápida de micobacterias (29).

Pruebas bioquímicas. Por mucho tiempo, las pruebas bioquímicas se han usado como el estándar para la identificación de micobacterias. Desafortunadamente, éstas requieren de dos a tres semanas para concluirse pero a pesar de esto, no se pueden dejar de usar en los laboratorios ya que tienen un bajo costo.

2.3 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Las diferencias del grado de sensibilidad, entre cepas que han sido expuestas a antibiótico, reflejan la proporción de mutantes resistentes a antibióticos que se han acumulado en una proporción bacteriana como resultado de una selección inducida por esta exposición. El primer reporte de la Organización Mundial de Salud (OMS) (7), sugirió que la proporción crítica de mutantes resistentes que se podría considerar en el caso de isoniacida, PAS y rifampicina, era del 1% y de 10% para el resto de los antibióticos. Para estreptomycin fue 1% inicialmente pero luego se cambió a 10% (6).

De acuerdo a los estándares aceptados en Estados Unidos, un cultivo es considerado "sensible" si la proporción resistente de esa mutante es menor a 1% de la población bacteriana, cuando se prueban concentraciones críticas de varios antibióticos probados en varios medios. Se recomienda el medio 7H11 en lugar del Lowenstein-Jensen ya que el primero es transparente y las micobacterias desarrollan en menos tiempo.

Actualmente, existen tres métodos convencionales que emplean concentraciones críticas para determinar cuando una cepa de *M. tuberculosis* es sensible o resistente (31):

- a) El método de las proporciones
- b) El método de rango de resistencia y
- c) El método de concentración absoluta.

Dichos métodos pueden ser realizados como métodos directos o indirectos. En el método directo, medio con antibiótico y medio sin antibiótico, son inoculados directamente con la muestra concentrada. En el método indirecto, la inoculación del medio se hace con un cultivo puro y ya desarrollado previamente en el medio.

El método directo se realiza principalmente a muestras con tinción positiva y el inóculo se ajusta de acuerdo al número de bacilos ácido-alcohol-resistentes (BAAR) encontrados en la tinción. El CDC sugiere los siguientes estándares de acuerdo al método de tinción de Ziehl-Nielsen y observación microscópica de 800x a 1000x. La muestra deberá ser diluida para una doble inoculación (0.1 ml para cada unidad de medio).

- Sin dilución a 10^{-2} si se encuentra menos de 1 BAAR por campo.
- 10^{-1} y 10^{-3} si hay de 1 a 10 BAAR por campo.
- 10^{-2} y 10^{-4} si hay más de 10 BAAR por campo.

El método indirecto se realiza con la suspensión bacteriana a partir del desarrollo en el medio sólido. La suspensión usualmente se ajusta a la densidad óptica del estándar no. 1 de Mc Farland y se utilizan diluciones 10^{-2} y 10^{-4} las cuales se inoculan en dos cuadrantes con medio. Para este método también podemos utilizar un cultivo desarrollado en caldo 7H9 cuando se obtiene la misma turbidez.

Las ventajas del método directo, son que los resultados estarán disponibles en menos tiempo y que son representativos de la población bacteriana original del paciente. Si los resultados del método directo no son válidos por escaso o excesivo desarrollo del microorganismo en el cuadrante control sin antibiótico o por contaminación, la prueba debe ser repetida con un cultivo puro usando el método indirecto.

Para tener resultados reproducibles, es importante seguir los siguientes pasos:

1. Estandarización del inóculo.
2. Protocolos detallados para preparación del medio, para realizar la técnica y para leer y reportar resultados.
3. Controles de calidad, principalmente usar las dos cepas de referencia de *M. tuberculosis*, una completamente sensible a todos los antibióticos y otra resistente a todos o a la mayoría de los antibióticos.

Es importante, en ambos métodos, la preparación adecuada de las soluciones de antibióticos. Estos deben ser obtenidos puros y directamente del fabricante. Para que el antibiótico conserve su potencia, debe ser guardado en vacío, dentro de un desecador y en refrigeración al menos de lo recomendado por el fabricante. Algunos antibióticos deben ser protegidos de exposición a la luz.

2.3.1 Método de las proporciones

2.3.1.1 Método original

Este método fue descrito por la OMS reportado por Canetti y J. Grosset (7) y después se reportó un segundo método por Canetti y Rist en colaboración con Grosset (6). El método original fue creado en medio Lowenstein-Jensen sin harina de papa. Las soluciones apropiadas de antibiótico, se deben añadir al medio antes de su coagulación y se debe preparar medio sin antibiótico para usarse como controles de crecimiento.

El inóculo debe ser preparado con una suspensión de microorganismos ajustada a una densidad óptica de una suspensión estándar que contenga 1 mg/ml de peso seco del bacilo tuberculoso o BCG; Se utilizan diluciones de 10^{-3} y 10^{-5} las cuales se inoculan en dos tubos que contengan el antibiótico y dos tubos sin antibiótico, se debe inocular 0.1ml de cada dilución. Los

tubos deben dejarse de 24 a 48 horas en una posición que permita que el inóculo sea absorbido en la superficie del medio, después de esto los tubos se deben incubar a 37°C.

Después de 28 días de incubación se cuentan las colonias en el tubo con antibiótico y los tubos sin antibiótico para calcular el rango entre ellas, esto indica la proporción de bacterias resistentes. Si a los 28 días el desarrollo es aún escaso, se debe continuar la incubación y hacer una segunda lectura a los 42 días para poder determinar si la cepa es o no es sensible.

2.3.1.2. Método de las proporciones versión CDC

En Estados Unidos el método de las proporciones es realizado más frecuentemente utilizando medio Middlebrook. La ventaja de este es que los resultados se pueden reportar en tres semanas a diferencia de las cuatro a seis semanas requeridas por el método original en medio Lowstein-Jensen (8).

2.3.1.3 Método de las proporciones versión disco

Este método se sugiere para los lugares donde se realizan pruebas de sensibilidad esporádicamente. Se utilizan discos impregnados de antibiótico los cuales son colocados asepticamente dentro de los cuadrantes de las cajas donde también se colocan 5 ml de medio de cultivo, el disco debe quedar sumergido y en el centro del cuadrante. Las cajas se deben dejar a 37°C toda la noche a excepción de etambutol que debe estar a 4°C. Mediante este método, los resultados de sensibilidad se obtienen en tres semanas (32).

2.3.1.4 Método de las proporciones modificado

Sugiere utilizar el medio 7H11 en lugar del 7H10 ya que el primero permite un mejor desarrollo de la cepas multirresistentes. La técnica de inoculación es la misma del método anterior al igual que el tiempo necesario de incubación (23,25,38,45,54,61,78,93).

2.3.2 Método rango de resistencia (RR)

Este método está descrito para usarse en medio Lowestien-Jensen sin harina de papa. Está definido como el rango de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para la cepa de un paciente, contra la CIM de una cepa de referencia, que sea sensible (H37Rv) al antibiótico, siendo ambos probados al mismo tiempo. La inclusión de la cepa de referencia en cada experimento, no sólo es para control de calidad sino para estandarizar los resultados permitiendo así algunas variaciones en la prueba. Esto hace al método muy preciso pero también el más caro de los métodos que se pueden probar en medio sólido ya que se requieren un elevado número de medios de cultivo para probar cada cepa (6,7).

2.3.3 Método de la concentración absoluta

Este fue descrito por la OMS (31), preparado por G. Meissner. Se utiliza medio Lowestein-Jensen sin harina de papa y con 0.75% de glicerol. Se coloca el antibiótico antes de coagular el medio. El crecimiento de 20 o más colonias en presencia de las concentraciones usadas, indica resistencia. Se sugiere que la concentración de antibiótico establecida como crítica, sea establecida por cada laboratorio.

La suspensión bacteriana debe ser ajustada a una concentración óptica equivalente a mg/ml de peso seco y una dilución de 1:50 la cual debe contener 2×10^5 - 10^6 bacteria/ml. Los medios con antibiótico y los dos controles sin antibiótico, deben ser incubados a 37 C durante 4 semanas y de 5 a 6 semanas si el crecimiento es insuficiente en la primer lectura. El resultado se reporta como sigue:

- ++++ = crecimiento confluyente en el medio control.
- +++ y ++ = colonias en gran cantidad.
- + = 50-100 colonias

- (+) = 20-49 colonias.

Se reporta que hubo inhibición de crecimiento, si el número de colonias es menor a 20 en el medio con antibiótico y +++++ o ++++ en el control. Esto indica que el desarrollo fue menor al 1% considerando la cepa como sensible y resistente, cuando el desarrollo es igual o menor al 1% (31).

2.3.4 Método radiométrico, automatizado (BACTEC)

2.3.4.1 Principios generales

Los métodos de sensibilidad en medios sólidos y mediante los métodos convencionales, requieren de largos períodos de incubación. Debido a la necesidad de utilizar métodos rápidos en micobacteriología, se comenzaron a probar técnicas radiométricas en 1960 y principios de 1970 (9,53). El mayor avance se logró en 1977 cuando un sistema radiométrico que utilizaba caldo 7H12 con ^{14}C -ácido palmítico como fuente de carbono, se comenzó a utilizar. Rápidamente el método radiométrico se comenzó a utilizar y posteriormente se desarrolló el sistema radiométrico BACTEC TB-460.

Este sistema utiliza el medio 7H12 enriquecido (7H9) el cual contiene base del medio 7H9, hidrolizado de caseína, albúmina bovina sérica, catalasa y ^{14}C -ácidos grasos y es conocido como medio 12B.

El consumo de sustrato durante el crecimiento de la bacteria, libera $^{14}\text{CO}_2$, el cual es detectado por el sistema BACTEC y determinado cuantitativamente como índice de crecimiento (IC) en una escala de unidades que van de 0 a 999. El incremento diario del IC registrado por el instrumento, es proporcional al crecimiento actual de la bacteria. En presencia de antibióticos contra el cultivo probado, la inhibición del crecimiento se detecta por la disminución diaria del IC (3,15,27,35,39,49,71,73,80,94).

Este sistema promete ser una eficiente herramienta para la detección temprana de cultivos positivos y para realizar pruebas de sensibilidad.

2.3.4.2 Pruebas cualitativas de sensibilidad mediante el sistema radiométrico

El inóculo para una prueba indirecta puede realizarse a partir de un cultivo micobacteriano desarrollado en medio 12B. El caldo se puede utilizar sin hacer diluciones, cuando el IC es de 500-800 y se debe hacer una dilución 1:2 cuando el IC es mayor. De acuerdo a las recomendaciones del fabricante, una vez inoculado el vial control y los viales que contienen el antibiótico a probar, se deben incubar de 4 a 12 días para poder interpretar los resultados mediante una Δ del crecimiento en el control comparada con la Δ del crecimiento en el vial con antibiótico. Considerando una cepa como sensible cuando el Δ del vial con antibiótico es menor al Δ del vial control y como resistente cuando el Δ del vial con antibiótico es mayor que el Δ del vial control.

2.3.4.3 Pruebas cuantitativas de sensibilidad (CIM) mediante el método radiométrico

Como una alternativa de las pruebas cualitativas, se pueden realizar pruebas cuantitativas mediante este sistema con la finalidad de conocer la CIM de antibiótico para cada cultivo, especialmente en el caso de las cepas multirresistentes. En este caso se realizan las pruebas a diferentes concentraciones de un mismo antibiótico.

2.4 PATOLOGÍA

La respuesta de un individuo luego de la exposición a bacilos tuberculosos virulentos, depende de una combinación de dos respuestas inmunológicas mayores: la inmunidad celular adquirida y la hipersensibilidad retardada. La aparición de hipersensibilidad a las proteínas del bacilo

tuberculoso es responsable de la destrucción de tejido, característica de la enfermedad. La sensibilización aparece aproximadamente tres o cuatro semanas después de la infección y se detecta por medio de la prueba con tuberculina. Una vez que el individuo se convierte en tuberculino positivo, la reacción positiva habitualmente persiste durante el resto de su vida (83).

De esta manera, las respuestas individuales luego de la exposición están determinadas por la experiencia inmunológica previa con el bacilo de la tuberculosis. La infección inicial con *M. tuberculosis*, se denomina tuberculosis primaria. La enfermedad posterior en un individuo previamente sensibilizado ya sea a partir de una fuente exógena o por reactivación de una infección primaria, se conoce como tuberculosis secundaria o reinfección (40,83).

Infección primaria. Luego de la inhalación de bacilos tuberculosos virulentos en núcleos de gotitas, los microorganismos llegan a los espacios alveolares donde son fagocitados por macrófagos alveolares. Dentro de los macrófagos, la multiplicación bacteriana tiene lugar con una reacción mínima, se disemina hacia los ganglios regionales en el hilio del pulmón y luego hacia el torrente circulatorio, con una siembra de bacterias en casi todas las partes del cuerpo. Se produce una diseminación linfohematógena asintomática de la infección primaria antes de la adquisición de la hipersensibilidad tuberculínica y establece el contexto para que la reactivación más adelante se presente como enfermedad pulmonar o extrapulmonar. Los bacilos circulantes son eficazmente eliminados del torrente circulatorio por órganos reticuloendoteliales, pero en los ápices pulmonares y en menor medida en los riñones, áreas esqueléticas vasculares y ganglios linfáticos continúa la multiplicación bacteriana. La alta tensión de oxígeno en los ápices pulmonares proporciona un medio favorable para los microorganismos y probablemente, este sea el motivo por el que desarrolla más en estas áreas.

Aproximadamente tres o cuatro semanas después de la infección, el desarrollo de inmunidad celular e hipersensibilidad tuberculínica, altera enormemente el curso de la infección. Los macrófagos activados limitan aún más el crecimiento bacteriano y reducen el número de microorganismos en los focos primarios y metastásicos.

Formación de tubérculos. La aparición de hipersensibilidad a la tuberculina, provoca un cambio notable en la respuesta del huésped a los microorganismos. La respuesta inflamatoria no específica, evocada con la primera exposición a bacilos tuberculosos es la forma granulomatosa, llevando a la formación de tubérculos (83). El tubérculo abarca un agregado organizado de macrófagos agrandados que, dado que se asemejan a células epiteliales, se denominan células epiteloides. Un collar de fibroblastos, macrófagos y linfocitos rodea el granuloma. Cuando la carga antigénica en el sitio de la infección inicial y ganglios linfáticos regionales es grande, puede producirse necrosis caseosa y luego calcificarse. Estas lesiones calcificadas en el sitio primario, se denominan complejo de Ghon (40,83).

Luego del desarrollo de hipersensibilidad, la infección se torna inactiva y asintomática en la mayoría de los pacientes (aproximadamente el 90%). Sin embargo, en algunos, especialmente los más jóvenes y adultos inmunocomprometidos o que presentan otras enfermedades predisponentes, la infección primaria puede evolucionar a una enfermedad clínica. La progresión puede ser local en el sitio de la lesión primaria o puede ocurrir en uno o más sitios alejados adonde los bacilos han llegado durante la diseminación hematógena temprana.

Tuberculosis secundaria o reinfección. En un número escaso de pacientes cuya infección tuberculosa inicial cede, se produce enfermedad secundaria a pesar de la presencia de inmunidad celular adquirida.

Debido a la inmunidad celular adquirida, los bacilos son más rápidamente fagocitados y destruidos por los macrófagos activados. Como resultado, en la tuberculosis secundaria las lesiones permanecen localizadas y habitualmente se previene la diseminación de microorganismos a través de los linfáticos. La hipersensibilidad promueve una más rápida caseificación y tabicamiento fibrótico del foco. Histológicamente la reacción es característica de la formación de tubérculos. La cronocidad de estas lesiones, se atribuye a los componentes de ceras D de los bacilos tuberculosos.

Tuberculosis pulmonar. Aproximadamente 50% de los pacientes infectados con tuberculosis, desarrolla algunos síntomas clínicos no específicos en el momento de la conversión tuberculínica. Lo distintivo de la infección tuberculosa inicial es la prominencia de las adenopatías hiliares comparadas con el tamaño relativamente insignificante del foco inicial en el pulmón.

En la mayoría de los pacientes, la lesión primaria cura totalmente, no dejando evidencias clínicas de infección previa, excepto la hipersensibilidad a la tuberculina. Sin embargo, en algunos pacientes, la infección primaria progresa directamente, evolucionando a un proceso neumónico caseoso a medida que los microorganismos se diseminan a través de los bronquios o cuando un nódulo tuberculoso se rompe hacia un bronquio. La diseminación puede causar infección en los espacios pleural y pericárdico. De hecho, la pleuresía y derrame son complicaciones importantes y comunes que ocurren poco después de la infección. El comienzo de la pleuresía habitualmente es brusco, semejando una neumonía bacteriana, con fiebre, dolor torácico y falta de aire.

En adultos la tuberculosis pulmonar generalmente es causada por microorganismos hematógicamente irrigados en los ápices pulmonares durante el estado prealérgico de la infección primaria. Estos focos metastásicos pueden evolucionar bastante rápido después de la irrigación o luego de un largo período de inactividad. Se producen pequeños parches de neumonía alrededor de

los focos, que se hacen caseosos a medida que aumenta la inflamación. Conforme la enfermedad progresa, hay un comienzo insidioso y desarrollo de síntomas constitucionales no específicos como fiebre, cansancio, anorexia, sudoración nocturna y desgaste. La tos y esputo son variables en cuanto al grado y momento de comienzo, pero denotan una enfermedad más avanzada dando inicio a tuberculosis crónica.

Tuberculosis extrapulmonar. Se produce tuberculosis miliar cuando los bacilos de la tuberculosis llegan a los linfáticos y torrente circulatorio irrigándose en órganos alejados. El término miliar describe los pequeños focos apenas visibles. Las lesiones miliares pueden desarrollarse en casi cualquier órgano del cuerpo, pero los sitios donde más frecuentemente se desarrolla una infección tuberculosa progresiva que se produce en ausencia de una respuesta inmunológica son, los huesos y articulaciones, vías genitourinarias, meninges, ganglios linfáticos y peritoneo.

2.5. INMUNOLOGÍA

Durante la tuberculosis se produce un granuloma en el pulmón y en otros órganos infectados. El daño en el pulmón causado por la reacción granulomatosa produce una cavidad.

La apariencia histológica de la lesión, es típica de una reacción granulomatosa con caseosis central (necrosis). Esto es rodeado por un área de células epiteliales, con unas cuantas células gigantes.

2.6 TRATAMIENTO

La quimioterapia contra la tuberculosis comenzó a finales de 1940 con la introducción de Estreptomicina (SM) y Rifampicina (RF), el mejor cambio en la terapia, se desarrolló a fines de 1960 (16). Durante el siglo pasado, hubieron pequeños progresos en la identificación y desarrollo de nuevos

antibióticos contra tuberculosis. El desarrollo de nuevos y mejores antibióticos ha sido deficiente incluso en ciudades desarrolladas debido a la poca atención por parte de la industria farmacéutica.

La quimioterapia con múltiples antibióticos se creó con la finalidad de disminuir la posibilidad de resistencia por la monoterapia que inicialmente se usaba. Por esto, se recomienda utilizar isoniazida (INH), estreptomina (SM), y ácido p-aminosalicílico (PAS) durante 18 a 24 meses. Posteriormente, fue cambiado PAS por etambutol (EMB) y RF por SM. La terapia intermitente supervisada y la terapia de corto tiempo se consideran ineficientes según el Consulado Británico en Investigación Médica. La INH combinada con RF durante nueve meses o INH, RF y pirazinamida (PZA) durante dos meses seguida de INH y RF por cuatro meses, se establecieron como regímenes cortos efectivos.

Aún en la actualidad, hay muy pocos estudios de regímenes de tratamiento de cepas multirresistentes (TBMR), particularmente con resistencia a INH, RF, EMB y SM. La resistencia a los llamados antibióticos de primera línea, se está presentando lentamente y a nivel mundial. Esto no parecía mostrar un grave problema hasta que surgieron los pacientes VIH positivos infectados con TBMR. Actualmente se ve la necesidad de crear antibióticos nuevos para el tratamiento de estas cepas.

El desarrollo de antibióticos nuevos para el tratamiento de micobacterias de crecimiento lento, es difícil debido al largo régimen necesario, el uso de terapia por múltiples antibióticos y la necesidad de evaluar los cambios durante la terapia.

Debido a esto, es necesario realizar pruebas *in vitro* para determinar la sensibilidad de la cepa que está infectando a un paciente determinado. Se deben realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* y el modelo de tuberculosis murina es necesario para validar la habilidad para prevenir la eficacia en enfermedad humana (16).

2.6.1 Modo de acción de los antibióticos para tratamiento de tuberculosis

Isoniacida y otros inhibidores de la síntesis de ácidos micólicos (etionamida y tiacetazona)

En 1946, la tiacetazona fue la primera de los tres antibióticos, que se propuso como antituberculoso (31). En 1952, otro trabajo realizado con tiosemicarbazonas permitió el descubrimiento de la actividad excepcional de la isoniacida contra tuberculosis, aunque este antibiótico ya se había sintetizado 40 años antes (31). La etionamida fue sintetizada en 1956 y su actividad antituberculosa, fue descrita en 1959 (31).

La isoniacida, es uno de los tres principales antibióticos usados en el tratamiento contra tuberculosis, mientras que la etionamida es considerada como antibiótico de segunda línea. La tiacetazona tiene la actividad más baja de los tres, fue recomendada para la quimioterapia contra tuberculosis en ciudades desarrolladas debido a su bajo costo y su eficacia confirmada en la clínica en combinación con INH (31).

Chorine reportó con el modelo murino de tuberculosis, que la nicotinamida tenía propiedades antituberculosas (31). Estos antibióticos son análogos de nicotinamida. Los mecanismos de acción aún no se establecen claramente. La INH actúa al parecer como un inhibidor en la síntesis de ácidos micólicos aunque se ha propuesto que su acción es como antimetabolito para NAD o piridoxal fosfato. Los estudios recientes de Quemard y cols. (60), sugieren que la resistencia puede no deberse a diferencias en la toma del antibiótico o el nivel de actividad de peroxidasa. Se encontró un decremento en la síntesis de ácidos micólicos extraídos de *M. avium* INH-resistentes comparado con las cepas de *M. avium* sensibles. Cole y cols. recientemente encontraron la caracterización de un gene KatG de *M. tuberculosis*, el cual codifica para la actividad de catalasa y peroxidasa (94). Este gene

restauró la sensibilidad a INH en una cepa mutante resistente de *M. smegmatis*. La delección de este gene del cromosoma, se asoció a resistencia en dos aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

En cuanto al modo de acción de etionamida, se cree que también es un inhibidor en la síntesis de ácidos micólicos aunque su blanco es diferente al de isoniacida, por esto no se presenta resistencia cruzada. Su mecanismo de resistencia aún se desconoce.

Rifamicinas

La rifampicina fue introducida en 1966 (31) y junto con la INH, ha llegado a ser uno de los dos más importantes antibióticos en la quimioterapia contra tuberculosis. Se cree que el modo de acción de la rifampicina y otras rifamicinas, está relacionado con la inhibición de la RNAPolimerasa dependiente de DNA, formando un complejo estable con la enzima: por esto, la rifampicina es considerada como un inhibidor de la transcripción (31).

Aminoglucósidos: Estreptomina, Amikacina y Kanamicina

Los tres, se conocen como inhibidores de la translación y su modo inicial de acción es la inhibición de la síntesis de polipéptidos relacionada a la habilidad de estos antibióticos para inducir un error en la lectura por el ribosoma (31). Se sabe que el descubrimiento de estreptomina en 1944 (31) marcó el inicio de la quimioterapia moderna de la tuberculosis.

Etambutol

Fue introducido por los laboratorios Lederle en 1961 y en 1966 (31), fue recomendado para usarse contra tuberculosis en una publicación de la revista Tubercle. El modo de acción de este antibiótico, está asociado probablemente con su habilidad para enlazarse a la pared celular de la micobacteria (62), lo cual causa una pérdida de ácidos micólicos en la célula bacteriana (31). Su

habilidad para inhibir la biosíntesis del RNA es otro modo de acción que se debe tomar en cuenta (31).

Ácido p-aminosalicílico (PAS)

La actividad antituberculosa del PAS en condiciones experimentales y en pacientes con tuberculosis se reportó en 1946 (31), pero fue hasta el descubrimiento de SM en 1944 y la introducción de INH en 1952, cuando PAS comenzó a ser un componente importante en la quimioterapia contra tuberculosis. Actualmente, aún se desconoce el modo real de acción de PAS, se propone como un inhibidor en la síntesis de ácido fólico, o como interferente en la toma y utilización de ácido salicílico, lo cual puede afectar algunas rutas de la toma de hierro (31).

Se ha reportado resistencia cruzada con tiacetazona (31) ya que las cepas resistentes a PAS, también lo son a tiacetazona, pero las cepas resistentes a tiacetazona, son sensibles a PAS.

Quinolonas

El uso de quinolonas en la quimioterapia de infecciones micobacterianas, comenzó con el reporte acerca del uso de ofloxacina (31). Las quinolonas incluyen algunos grupos de antibióticos derivados de ácido carbónico heterocíclico, los cuales están relacionados estructuralmente a ácido nalidíxico. El mecanismo de acción de las quinolonas es la inhibición de la DNAgirasa, una enzima esencial para mantener al DNA superenrollado. Los mecanismos de resistencia de las quinolonas, parecen estar dados por alteraciones en las subunidades A y B las cuales constituyen la DNAgirasa (8,31).

β -lactamasas

Entre estas se encuentran amoxicilina y ampicilina, entre otras. Su modo de acción es mediante la ruptura de los enlaces β -lactámicos lo cual provoca un daño a la bacteria (31).

2.7 EPIDEMIOLOGÍA

2.7.1 Tuberculosis mundial

Hu Ching-Li, OMS, reportó que casi una tercera parte de la población mundial presenta la infección latente de tuberculosis (75). Arriba de 8 millones de casos y casi 3 millones de muertes ocurren anualmente. La tuberculosis es un problema grave principalmente en ciudades en desarrollo (75), ya que se sabe que en 1990, 95% de los casos ocurrieron en esas ciudades. Más de 80% de los casos ocurrieron en personas en edad reproductiva (15-59 años). Esta situación continúa a pesar de las más costosas y efectivas intervenciones (67) que se han usado sucesivamente, bajo condiciones difíciles en ciudades en desarrollo.

Actualmente la OMS está planeando e implementando un gran esfuerzo para confrontar la tuberculosis. El desarrollo total de esos esfuerzos, se une con la colaboración activa de organizaciones de gobierno y comunidades rurales para seguir los pasos necesarios.

Desde 1960 se han reportado casos de la enfermedad en adultos como resultado de la reactivación de una infección latente de *M. tuberculosis* (67). Debido a esto, los esfuerzos para erradicar la infección, se han enfocado a la identificación y tratamiento correcto durante la infección latente.

Sin embargo, estudios recientes sugieren que la contribución relativa de tuberculosis primaria a rangos elevados de enfermedad en adultos, es substancial, especialmente entre los individuos VIH positivos.

Daley y cols. (67) demostraron el rango potencialmente elevado, del progreso de la enfermedad activa entre individuos VIH positivos expuestos a infección. En ese brote, 11 (37%) de 30 personas VIH positivas, que vivían en congregaciones, desarrollaron tuberculosis activa después

de seis meses de exposición a pacientes con tinción de Ziehl-Nielsen positiva en sus muestras de expectoración.

Más de un millón de personas en los Estados Unidos y arriba de 10 millones mundiales, están infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (67,72). Trabajos recientes han demostrado que cada infección (VIH-*M. tuberculosis*), tiene un grave efecto en la historia natural de los demás. La interacción entre esas dos infecciones, se ha visto altamente incrementada causando altos niveles de morbilidad entre los pacientes.

En general, las personas infectadas con VIH están 170 veces más propensos a desarrollar tuberculosis activa (67). Las razones de esto, son:

1) Que entre las personas infectadas con VIH, la tuberculosis activa desarrolla en rangos de 8-10% al año;

2) La disminución en los niveles de CD4 de las personas VIH positivas, permite el progreso de *M tuberculosis* para producir tuberculosis activa incrementada a un 37% en los primeros seis meses y de 2 a 5% durante el primer año.

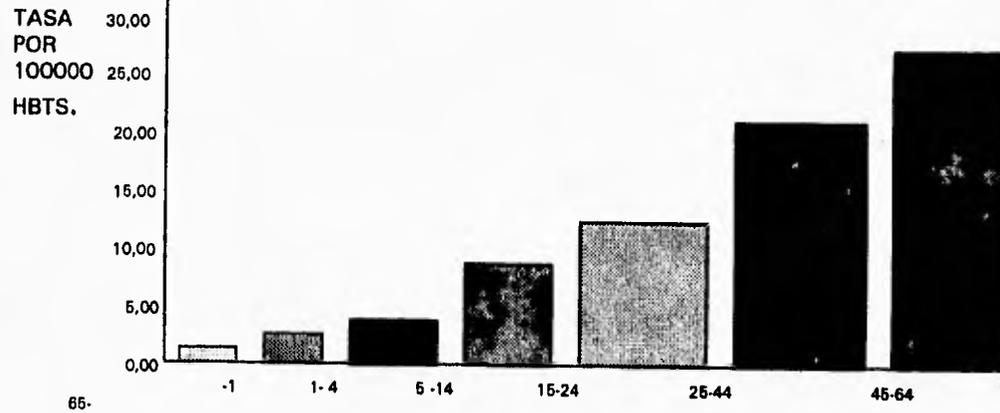
Es particularmente importante determinar la sensibilidad de las cepas que infectan a pacientes HIV positivos ya que de esto depende la eficiencia del tratamiento.

2.7.2 Tuberculosis en México

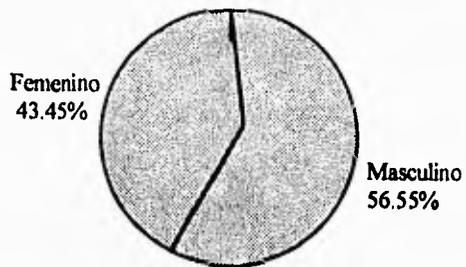
Durante 1991 se notificaron 8660 casos nuevos de tuberculosis lo cual representa una incidencia de 9.9 casos de tuberculosis en todas sus formas por cada 100 000 habitantes (14). El mayor número de los casos se encuentran en grupos de edades mayores de 15 años; 15-24 años, con 1657 casos y tasa de 8.2 por 100 000 habitantes; 25-44 años, 2972 casos con tasa de 12.6; 45-64 años, con 2190 casos y tasa de 21.8; 65 y más años con 907 casos y tasa de 26.7 (gráfica 1). Con

respecto al sexo, los casos se han presentado en mayor proporción en hombres con el 56.5 % y una relación de 1.3 casos masculinos por cada caso femenino (gráfica 2)(57).

Gráfica 1. Casos de tuberculosis en todas sus formas



Gráfica 2. Casos de tuberculosis por sexo. 1991



La incidencia de tuberculosis por área geográfica muestra que los estados con mayores tasas fueron: Tamaulipas con 25.1 por 100 000 habitantes; Colima, 25; Nayarit, 24.9; Baja California, con 22.6 y Guerrero, con 19.8 por 100 000 habitantes.

De los casos de tuberculosis notificados, el 93.8% son de localización pulmonar, seguido de otras formas de tuberculosis, como la genital, renal y ósea, que representan el 5.1%; la tuberculosis meníngea, el 0.6 %; se ignora la localización en el 0.6 %. Más del 80% de los casos corresponden a edades mayores de 15 años principalmente por tuberculosis pulmonar, y en los menores de cinco años por tuberculosis meníngea (2).

3. JUSTIFICACIÓN

México es un país endémico de tuberculosis. En estudios previos se ha demostrado una prevalencia considerable de cepas aisladas de pacientes, lo que puede constituir un grave problema de salud pública.

En un sujeto con tuberculosis se debe iniciar tratamiento inmediato, los métodos que proporcionan la sensibilidad del microorganismo *in vitro* requieren de largos periodos de incubación, lo que favorece la generación de cepas multirresistentes.

Tomando en cuenta la facilidad de transmisión de la tuberculosis pulmonar y la posibilidad de que exista resistencia, se requiere de un método relativamente rápido y seguro para hacer el diagnóstico temprano en pacientes con tuberculosis, así como la identificación correcta y pruebas de sensibilidad *in vitro* para realizar los ajustes oportunos al tratamiento.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Comparar el método radiométrico con los métodos no radiométricos para el aislamiento, la identificación y la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de *M. tuberculosis*.

4.2 ESPECÍFICOS

1) Comparar la eficacia del método no radiométrico para el aislamiento de cultivos positivos de micobacterias (cultivo en medio Lowestein-Jensen) contra método radiométrico (cultivo en caldo 12B).

2) Determinar la eficacia del método radiométrico para la diferenciación entre el complejo *M. tuberculosis* y otras micobacterias.

3) Determinar la sensibilidad antimicrobiana de cultivos clínicos de *M. tuberculosis* a antibióticos de primera y segunda línea, tanto por el método radiométrico como por el método de elución con disco en agar.

5. HIPÓTESIS

5.1 ALTERNA

El método radiométrico es más eficiente que el método convencional para la determinación de sensibilidad en cultivos de *M. tuberculosis* obtenidos de muestras clínicas.

5.1 NULA

El método radiométrico no es más eficiente que el método por elución con disco para determinar la sensibilidad de cultivos de *M. tuberculosis* obtenidos de muestras clínicas.

6. MATERIALES

6.1 CEPAS BACTERIANAS

M. tuberculosis ATCC H37Rv.

2720 muestras clínicas para cultivo.

162 cultivos de *Mycobacterium* sp para la identificación de la especie.

76 cultivos de *M. tuberculosis* obtenidos de muestras clínicas previas.

41 cultivos clínicos de *M. tuberculosis* obtenidos del cepario del laboratorio de Microbiología clínica del INNSZ.

6.2 MATERIAL DE LABORATORIO

*Asa de alambre.

*Guantes de látex

*Batas de algodón.

*Matraces Erlen-Meyer

*Bulbos de látex.

*Mechero de gas

*Cubre bocas.

*Pipetas Pasteur.

*Gradillas

*Portaobjetos.

6.3 EQUIPO DE LABORATORIO

*Sistema radiométrico BACTEC TB 460, Becton-Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD USA.

*Cajas petri desechables, con 4 divisiones, Falcon 1009, Becton Dickinson Labware, B-D Company, New Jersey USA.

*Jeringas de Insulina 100 U, Plastipak B-D de México, Cuautitlán, Edo. Méx.

*Campana de seguridad biológica tipo III, Forma Scientific, Marietta Ohio, USA

*Ultracongelador Revco de -20°C Forma Scientific.

*Ultracongelador Revco de -70°C Forma Scientific.

*Incubadora automática de CO₂ Forma Scientific.

*Centrifuga GS-6 Beckman, USA.

*Refrigerador Kelvinator, México, D.F.

*Incubadora de CO₂ Modelo 4100 de NAPCO Scientific Company, Oregon, USA.

*Balanza analítica Denver Instrument Company AA-250, Arvada Colorado, USA.

*Vortex Lab-Line Instruments, Inc. Illinois, USA

6.4 REACTIVOS

*Hidróxido de sodio en lentejas, J.T. Baker de México, Xalostoc, México

*Citrato de sodio, J.T. Baker.

*Fosfato dibásico de sodio, J.T. Baker.

*Fosfato monobásico de potasio, J.T. Baker.

*Cristales de fenol, J.T. Baker.

*N-acetil-l-cisteína, Sigma Chemical Co. St. Louis, USA.

6.5 MEDIOS DE CULTIVO

*Agar Middlebrook 7H11 (M7H11), Difco Labs., Detroit Michigan, USA

*Lowestein-Jensen (LJ), Difco Labs.

*Gelosa sangre de carnero al 5% (GSC), Difco Labs.

*Medio Agar Mc Conkey, Difco Labs.

*Enriquecimiento Middlebrook OADC, Difco Labs.

*Bactec 12B (M7H12), Becton-Dickinson (B-D) Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD USA

*Viales con p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona (NAP), B-D.

*Viales con fluido diluyente (DF), B-D.

*Viales con fluido reconstituyente (RF), B-D.

*Viales con PANTA (polimixina B, anfotericina B, ác. nalidixico, trimetoprim y azlocilina), B-D.

6.6 ANTIBIÓTICOS

6.6.1 Liofilizados de Becton-Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md USA

*Estreptomina

*Isoniacida

*Rifampicina

*Etambutol

- *Tiacetazona, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.
- *Cicloserina, Sigma.
- *Etionamida, Sigma.
- *Ác. p-aminosalicílico (PAS), Sigma.
- *Kanamicina, Bristol Myers Squibb de México, D.F.
- *Amikacina, Bristol Myers Squibb.
- *Ofloxacina, Cilag de México, D.F.
- *Ciprofloxacina, Bayer de México, D.F.
- *Amoxicilina, Sanfer de México, D.F.
- *Clavulanato, Sanfer.

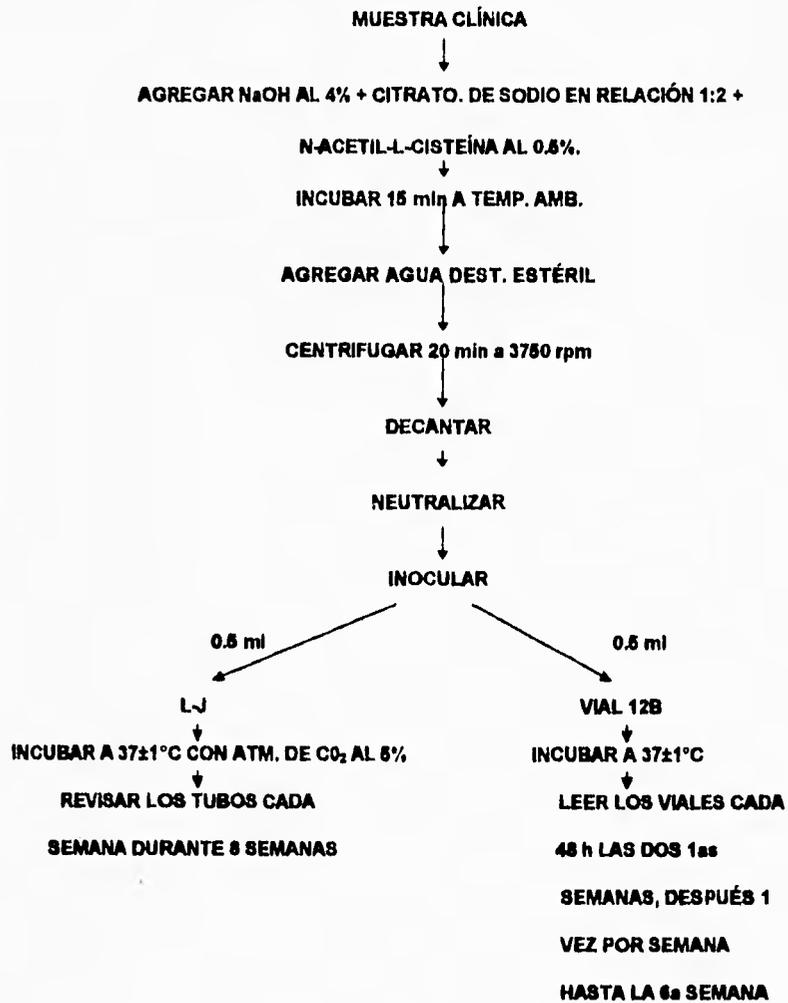
6.6.3 Sensidiscos BBL, Becton-Dickinson Microbiology Systems, Maryland, USA

*Estreptomina	10 y 50 mg/disco
*Isoniacida	1 y 5 “
*Rifampicina	5 y 10 “
*Etambutol	25 y 50 “
*Kanamicina	30 “
*Etionamida	25 “
*Ác. p-aminosalicílico (PAS)	10 y 50 “
*Amikacina	30 “
*Ciprofloxacina	5 “

7. MÉTODOS

7.1 DESCONTAMINACIÓN Y CULTIVO DE MUESTRAS CLÍNICAS

ESQUEMA 1. DIGESTIÓN-DESCONTAMINACIÓN DE MUESTRAS CLÍNICAS



Este procedimiento fue realizado para cada una de las muestras clínicas de pacientes para diagnóstico de tuberculosis (45,78,93).

A) Las muestras líquidas con un volumen > 5 ml se centrifugaron a 3750 rpm durante 15 min. Se decantaron desechando el sobrenadante.

B) Las muestras de tejido fueron maceradas en mortero en su medio de transporte, hasta obtener la mayor fragmentación posible.

Ambos tipos de muestras fueron digeridas y descontaminadas por el método de NaOH-N-acetil-l-cisteína (45,78):

1. El sedimento o el tejido molido fueron resuspendidos con una solución de NaOH + citrato de sodio en proporción 1:2 y N-acetil-l-cisteína al 0.5%, y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos exactos.

2. Después de la incubación se lavaron agregando agua destilada estéril hasta completar un volumen de 45 ml.

4. Se centrifugaron a 3750 rpm durante 20 min.

5. Se decantaron y el sedimento se neutralizó con amortiguador de fosfatos pH 6.8.

6. Posteriormente con jeringa de insulina se sembraron 0.5 ml en medio LJ.

a) El medio de LJ se incubó a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en una atmósfera al 5% de CO_2 durante 8 semanas.

b) Se revisaron los tubos semanalmente.

7. Se sembraron 0.5 ml en un vial 12B.

a) Previamente se estabilizó cada vial en el sistema BACTEC TB 460 para proporcionar una atmósfera de CO_2 al 5%.

b) A cada vial se le adicionó 0.1 ml de PANTA (Polimixina B, 50 U/ml; anfotericina B, 5 mg/ml; ácido nalidíxico, 20 mg/ml, trimetoprim 5 mg/ml y azlocilina, 10 mg/ml).

c) Los viales 12B se incubaron a $37\pm 1^\circ\text{C}$.

d) Se hicieron 5 lecturas, una cada 48 h, durante dos semanas y, posteriormente, una lectura cada semana hasta completar 6 semanas.

8. Una gota de cada muestra se sembró en GSC para control de contaminación; se incubó a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 h, se revisaron y, en caso de contaminación, se repitió el proceso de digestión-descontaminación. Si la contaminación persistió, se realizó un frotis con la tinción de Z-N reportando el resultado y se desechó la muestra.

7.2 AISLAMIENTO DE *M. tuberculosis* A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS

7.2.1 Medio de LJ

Para considerar un cultivo positivo en LJ, se hizo un frotis del desarrollo observado, teñido por Z-N. En caso positivo se realizaron pruebas bioquímicas convencionales.

7.2.2 Medio 12B

Después de la incubación, se realizaron lecturas en el sistema BACTEC TB 460. Las lecturas de la concentración de $^{14}\text{CO}_2$ detectada por el sistema electrónico del aparato indican un número que va de 0 a 999 llamado Índice de Crecimiento (IC) el cual es proporcional al número de micobacterias que desarrollaron en el medio de cultivo.

Los cultivos con IC >10 en los viales 12B se leyeron diariamente hasta que el IC fue de 80-100, se realizó frotis y tinción de Z-N. En caso positivo se resembraron 0.2 ml en medio LJ y se incubaron a 37±1°C en una atmósfera de CO₂ al 5% hasta el desarrollo abundante de bacilos ácido-alcohol-resistentes (BAAR), para realizar pruebas bioquímicas convencionales.

7.3 IDENTIFICACIÓN

7.3.1 Pruebas bioquímicas

Para la identificación de especies se realizaron pruebas bioquímicas convencionales del cultivo desarrollado en LJ: desarrollo en medio Mc Conkey, fotocromogenicidad, velocidad de crecimiento, producción de catalasa, reducción de nitratos, producción de niacina, arilsulfatasa, pirazinamidasasa (45,78).

7.3.2 Método radiométrico

Para aislados recuperados en LJ se hizo una suspensión de los microorganismos al estándar no. 1 de Mc Farland en agua destilada estéril y se inocularon 0.2 ml en un vial 12B, previamente estabilizado; se incubó a 37±1°C, realizando lecturas diarias en el sistema BACTEC TB460, hasta IC mayor o igual a 100 con Z-N positivo.

1. Se incubaron los viales hasta tener un IC=100.
2. Cuando el IC fue mayor se realizaron diluciones inoculando en otro vial 12B, el cual sirvió como control de crecimiento.
3. A partir de este vial, se tomó 1 ml que se inoculó en el vial que contiene el disco impregnado con 5 mg de NAP.

4. Ambos viales se incubaron a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ y se leyeron de 3 a 5 días iniciando el día en que se inocularon.

7.3.2.1 INTERPRETACIÓN

Comparar el IC en el vial con NAP contra el IC en el vial control.

Sensible si: $\text{IC}_{\text{control}} > \text{IC}_{\text{NAP}}$ \longrightarrow Cepa del complejo *M. tuberculosis*.

Resistente si: $\text{IC}_{\text{control}} < \text{IC}_{\text{NAP}}$ \longrightarrow Cepa de *Mycobacterium sp.*

7.3.2.2 CONTROL DE CALIDAD

Sensible: *M. tuberculosis* ATCC H37Rv.

Resistente: Aislado clínico de *Mycobacterium sp.*

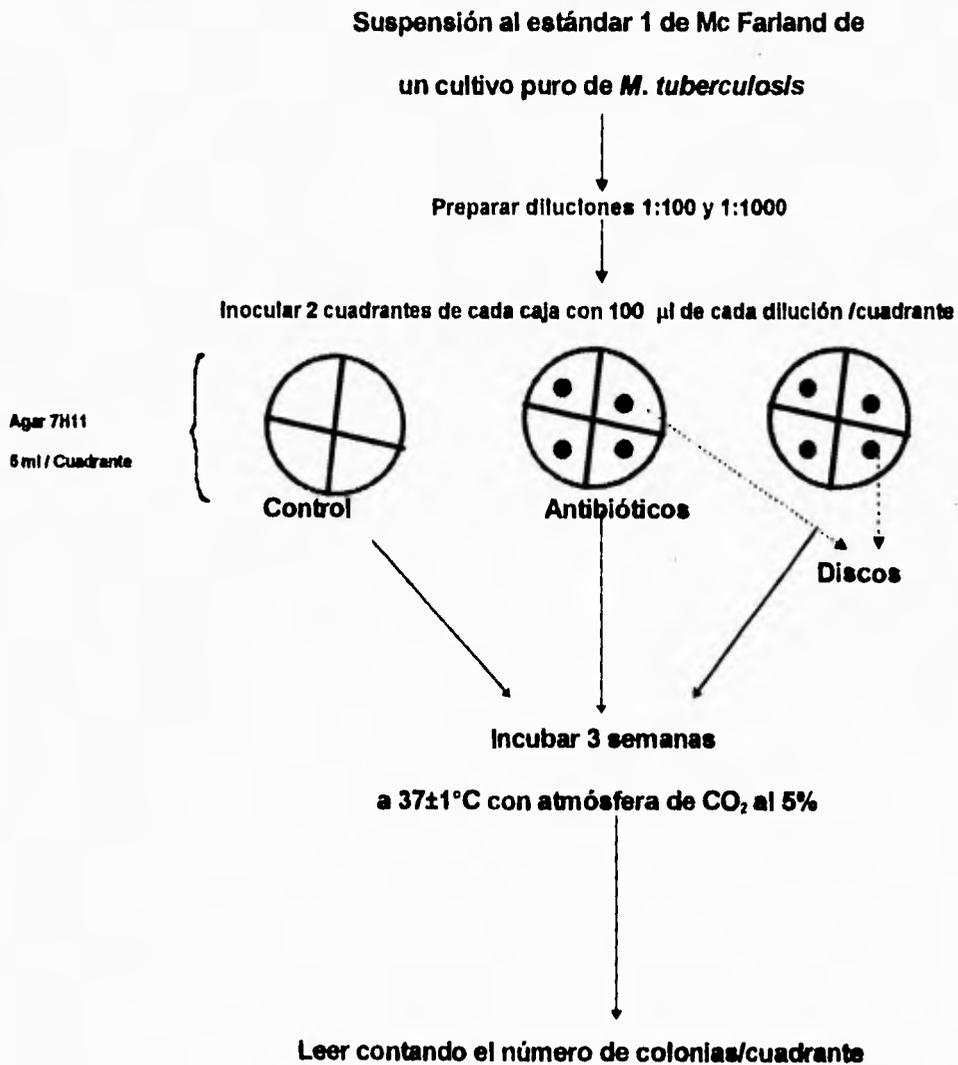
7.3.2.3 LIMITACIONES

En caso de disminución del IC del vial control, se repitió la prueba; un buen control debe presentar un crecimiento ascendente día con día.

7.4 SENSIBILIDAD

74.1 Método de elución con disco

ESQUEMA No. 2. MÉTODO DE SENSIBILIDAD POR ELUCIÓN CON DISCO EN AGAR



7.4.1.1 Preparación del medio

1. Se preparó medio de cultivo M7H11 con enriquecimiento OADC según recomendaciones del fabricante.
2. En caja Petri dividida en cuadrantes se vaciaron 5 ml en cada uno.
3. En condiciones estériles, se colocó un disco de cada concentración de antibiótico en el centro del cuadrante, el cual fue introducido en el medio, con un aplicador estéril, antes de que solidificara.
4. La concentración final de cada antibiótico, es igual a la concentración del antibiótico en mg/disco/5 ml de medio; por ejemplo, para estreptomina de 10 mg/disco, se tiene, que:
$$10 \text{ mg}/5 \text{ ml} = 2 \text{ mg/ml (concentración crítica).}$$
5. Se prepararon cajas con medio de cultivo sin antibiótico para control de crecimiento de cada aislado probado.
6. Todas las cajas, excepto las que contenían el disco con etambutol, se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h para la elución del antibiótico y para control de calidad del medio. Las cajas con etambutol se guardaron inmediatamente a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h.

7.4.1.2 Preparación del inóculo

1. Del cultivo obtenido en medio LJ se tomó una asada del microorganismo y se suspendió en agua destilada estéril, con perlas de vidrio para homogeneizar, se agitó y se dejó reposar unos minutos para que las partículas grandes sedimentaran.
2. Se ajustó la concentración del estándar no. 1 de Mc Farland.
3. Se realizaron diluciones 1:100 y 1:1000.

4. De cada dilución se inocularon 100 µl por concentración y por antibiótico y 2 cuadrantes para control de crecimiento sin antibiótico; el inóculo fue esparcido con varilla de vidrio estéril.

5. Las cajas se incubaron a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera de CO_2 al 5% y en oscuridad durante 3 semanas.

6. Después de la incubación se contaron las colonias en cada cuadrante. Primero se observó el control de crecimiento el cual debía presentar de 50 a 400 colonias para considerar válida la prueba. Se contaron además las colonias por antibiótico y por dilución.

7.4.1.3 Cálculo de resultados

No. de col. en el cuadrante con antib./No. de col. en el cuadrante control X 100 = % de resistencia.

7.4.1.4 Interpretación

Resistente : No. de col. antibiótico \geq 1% del no. de col. control.

Sensible : no. de col. antibiótico < 1% del no. de col. control.

7.4.1.5 Control de calidad

M. tuberculosis H37Rv.

7.4.1.6 Limitaciones

La prueba se repitió cuando el no. de colonias en las cajas control (cajas sin antibiótico) fue menor de 50 o mayor de 400.

7.4.2 Método radiométrico

7.4.2.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRE DE ANTIBIÓTICOS

1. Los antibióticos liofilizados se reconstituyeron con 5ml de agua destilada estéril y se guardaron en alícuotas a -20°C .

2. Las sales puras se prepararon usando la siguiente fórmula:

$$CV = C'V', \text{ por lo tanto } C'V'/V = C,$$

$$\text{entonces: } CV_0 / \text{pot.} = X \text{mg},$$

donde:

V = Volumen de solución stock, que se debe agregar en el medio = 0.1ml.

C' = Concentración final deseada en mg/ml.

V' = Volumen de medio en vial 12B = 4 ml.

V₀ = Volumen a preparar, de solución stock.

Pot. = Potencia del antibiótico en mg/mg.

C = Concentración de la solución stock.

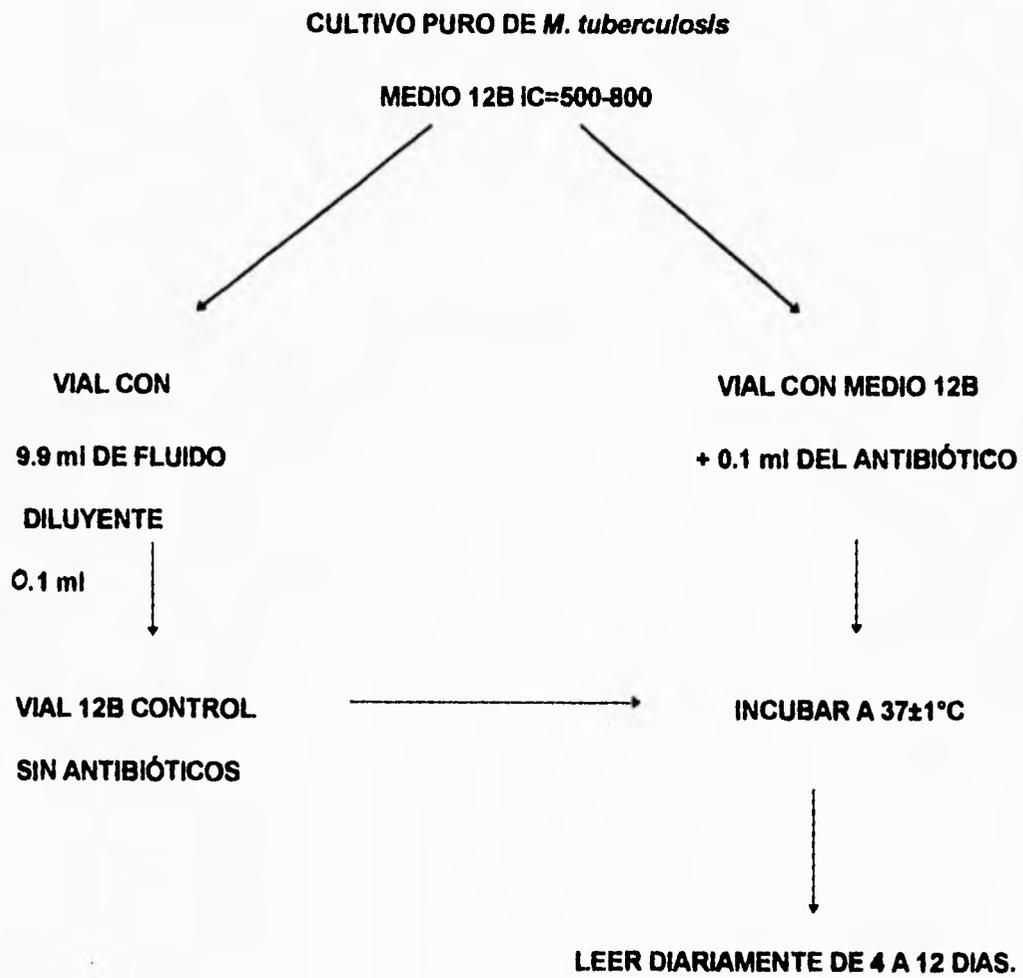
X = mg de antibiótico a pesar.

Se alícuotaron y guardaron a -20°C .

3. Se inocularon 0.1 ml de la solución stock de cada antibiótico en un vial 12B para cada antibiótico.

7.4.2.2 Preparación del inóculo

ESQUEMA No. 3. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD POR MÉTODO RADIOMÉTRICO



Se utilizaron los cultivos desarrollados en viales 12B con IC de 500-800 (esto se considera una suspensión de microorganismos igual al estándar no. 1 de Mc Farland),

1. Del vial con el cultivo de micobacterias se inocularon 0.1 ml en cada vial con antibiótico y 0.1 ml en un vial con 9.9 ml de fluido diluyente para hacer una dilución 1:100, de esta dilución se tomaron 0.1 ml y se inocularon en un nuevo vial 12B que representó el 1% del desarrollo micobacteriano y se usó como control de crecimiento.

2. Una vez inoculados todos los viales, se incubaron a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ y se realizaron lecturas diarias en el sistema radiométrico BACTEC TB 460 cada 24 ± 2 h hasta que el IC en el control fue mayor de 30 entre el 4 y 12 día de incubación.

7.4.2.3 Interpretación

Sensible : $\Delta \text{IC}_{\text{antibiótico}} < \Delta \text{IC}_{\text{control}}$

Resistente : $\Delta \text{IC}_{\text{antibiótico}} > \Delta \text{IC}_{\text{control}}$

Indeterminado : $\Delta \text{IC}_{\text{antibiótico}} = \Delta \text{IC}_{\text{control}}$, en este caso se repitió la prueba.

7.4.2.4 Control de calidad

M. tuberculosis H37Rv.

7.4.2.5 Limitaciones

La prueba se repitió cuando el IC en el vial control fue mayor de 30 antes del cuarto día de incubación ó menor de 30 después del día 12.

7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN), donde los valores positivos corresponden a aislados resistentes y los valores negativos corresponden a aislados sensibles.

8. RESULTADOS

Se procesaron 2720 muestras clínicas de las cuales se obtuvieron 93 cultivos positivos para micobacterias (3.41 %), de 84 pacientes. Las muestras que se procesaron con frecuencia fueron orina y expectoración (tabla 3), con una recuperación de cultivos positivos de 1.4 % y 7.3 % respectivamente (tabla 3). El medio 12B permite el desarrollo de 88.17 % del total de cultivos positivos mientras que el medio LJ solo 69.88 %.

En la tabla 4 y gráfica 3, se muestra el porcentaje de cultivos positivos en cada uno de los medios de cultivo, en donde se observa en forma relevante que en el medio 12B hubieron 28 % de cultivos positivos que no desarrollaron en LJ mientras que sólo 11 % desarrollaron en LJ pero no en 12B. En 54 % se detectó crecimiento en ambos medios. Como ya mencionamos, la mayor cantidad de muestras fueron de orina y expectoración, el medio 12B fue capaz de detectar 19.05 % y 36.11 % de cultivos positivos de dichas fuentes respectivamente mientras que el LJ sólo detectó 9.52 % y 8.33 %, siendo una desventaja para este último ya que la forma de transmisión más común de tuberculosis, es la pulmonar (39,71,80).

El tiempo de incubación requerido para el desarrollo de cultivos positivos, en medio de LJ fue de un intervalo de 14 a 56 días con una media de 28.95 días, mientras que en 12B fue de 2 a 40 días y una media de 14.98 días para todos los cultivos en forma general; para *M. tuberculosis* el intervalo fue de 14 a 56 días en medio LJ con una media de 21 días mientras que en 12B el intervalo fue de 2 a 40 días con una media de 13 días y para *M. avium-intracellulare* el desarrollo en medio LJ fue de 49 días y en 12B de 2 a 9 días con una media de 4.5 días.

En la tabla 5 y gráfica 4, se puede observar que de los 93 cultivos positivos, 76 fueron cepas de *M. tuberculosis*, de los cuales, 28 % desarrolló en medio 12B y 10.6 % en medio LJ, mientras que 61.84 % desarrolló en ambos medios de cultivo. Del resto de los cultivos, 9 son cepas del complejo *M. avium-intracellulare* de las cuales 77.78 % desarrolló

solo en 12B mientras que en LJ y en ambos medios, sólo 11.1 %. De las especies *M. fortuitum* y *M. chelonae*, ambas desarrollaron mejor en medio LJ que en 12B.

Es importante aclarar que durante el estudio se obtuvo el desarrollo de 14 cepas identificadas como *M. gordonae* de las cuales 10 desarrollaron solo en medio LJ, 4 solo en medio 12B y 2 en ambos. Esta especie se considera contaminante.

En la tabla 6 se muestran los resultados de identificación de 162 aislados de *Mycobacterium* spp por pruebas bioquímicas convencionales y por el método radiométrico con la prueba de NAP. Esta última mostró una especificidad de 100% y sensibilidad de 100%, identificando 144 aislados del complejo *M. tuberculosis* y 18 de otras especies de micobacterias las cuales solo se descartaron como *M. tuberculosis* por morfología macroscópica, producción o carencia de pigmento, prueba de niacina y nitratos. El tiempo requerido para identificación por NAP fue de 2 a 4 días mientras que por pruebas bioquímicas se requirieron de 2 a 3 semanas para la identificación de la especie.

Las diferencias y similitudes encontradas por los dos métodos utilizados para realizar las pruebas de sensibilidad y por cada antibiótico probado se muestran en la tabla 7 y gráficas 5, 6 y 7 considerando el método radiométrico como estándar de oro. Es importante observar como para estreptomycin, isoniacida, y etambutol, los resultados correlacionan mejor por ambos métodos usados cuando la concentración del antibiótico en el método de disco es mayor que para el método radiométrico. El tiempo de incubación por el método radiométrico para determinar una cepa como sensible o resistente, fue de 4 a 12 días mientras que por el método convencional, se requirieron 3 semanas.

En la tabla 8 observamos la especificidad, la sensibilidad y los valores predictivos del método de disco comparado con el método radiométrico para los antibióticos de primera línea.

El patrón de susceptibilidad mostrado por los antibióticos de primera línea con los datos obtenidos del método radiométrico se presentan en la gráfica 5 y en la tabla 9; en la gráfica 8 se muestra el porcentaje de monorresistencia y multirresistencia que presentaron los aislados probados. En la tabla 10 y gráfica 9 se muestra la relación de resistencia entre los aislados multirresistentes y el resto de los antibióticos probados.

Tabla 3. Número de cultivos positivos para *Mycobacterium* spp por tipo de muestra.

Origen	Muestras procesadas	Cultivos positivos			
		Total	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium-intracellulare</i>	Otras micobacterias
Orina	1502	20(1.3)	15	0	5
Expectoración	495	36 (7.3)	30	5	1
Biopsias	223	6 (2.7)	6	0	0
Otros	170	4 (2.3)	2	2	0
Muestras post-mortem	93	3 (3.2)	3	0	0
Lavado bronquial	92	14 (15.2)	12	0	2
Fluido cerebroespinal	40	2 (5)	2	0	0
Mielocultivo	39	5 (13)	3	2	0
Jugo gástrico	31	1 (3.2)	1	0	0
Abscesos	19	1 (5.3)	1	0	0
Líquido de ascitis	16	1(6.2)	1	0	0
Total	2720	93 (3.4)	76	9	8

Tabla 4. Comparación del número de cultivos positivos para *Mycobacterium* spp en cada medio de cultivo.

Muestra clínica	Desarrollo solo en Lowestein-Jensen (%)	Desarrollo solo en 12B (%).	Desarrollo en ambos medios (%)
Expectoración	3 (8.33)	13(36.11)	20 (48)
Orina	2 (10)	4 (20)	14(70)
Lavado bronquial	2(14.28)	2 (14.28)	10 (71.43)
Post-mortem	0 (0)	0 (0)	3 (100)
Biopsias	2 (33.3)	2 (33.3)	2 (33.3)
Otros	1 (25)	1 (25)	2 (50)
Fluido cerebroespinal	0 (0)	1 (50)	1 (50)
Líquido de ascitis	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Abscesos	0 (0)	1 (100)	0 (0)
Jugo gástrico	0 (0)	1 (100)	0 (0)
Médula ósea	2 (40)	3 (60)	0 (0)
Total	11(11.82)	28 (30.11)	54(58.06)

Tabla 5. Comparación del desarrollo de *Mycobacterium* spp en medio de Lowstein-Jensen y medio 12B (Bactec) por especie.

Especie	Desarrollo solo en Lowstein-Jensen	Desarrollo solo en 12B	Desarrollo en ambos medios
<i>M. tuberculosis</i>	8 (10.66)	21 (28)	47 (61.84)
<i>M. avium-intracellulare</i>	1 (11.11)	7 (77.78)	1 (11.11)
<i>M. fortuitum</i>	2 (50)	0 (0)	2 (50)
<i>M. chelonae</i>	1(33.33)	0 (0)	2 (66.66)
<i>M szulgai</i>	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Total	11 (11.82)	28 (30.11)	54 (58.06)

IDENTIFICACIÓN:

Tabla 6. Comparación de pruebas de identificación.

Identificación por NAP	Identificación por métodos estándar	
	<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium sp</i>
Sensible	144	0
Resistente	0	18

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD:

TABLA 7. Patrón de susceptibilidad de aislados clínicos de *M. tuberculosis* de acuerdo al antibiótico y método utilizado para cada concentración probada.

Antibiótico (concentración en método radiométrico y por disco en µg/ml)	Sensibles en ambos	Resistentes en ambos	Radiométrico		Disco	
			S	R	S	R
			VN	VP	FN	FP
Estreptomina (6 y 2)	89	11	15	2	2	15
Estreptomina (6 y 10)	100	9	4	4	4	4
Isoniacida (0.1 y 0.2)	78	33	3	3	3	3
Isoniacida (0.1 y 1)	79	27	2	9	9	2
Rifampicina (2 y 1)	84	24	7	2	2	7
Rifampicina (2 y 5)	84	24	7	2	2	7
Etambutol (7 y 5)	92	4	20	1	1	20
Etambutol (7 y 10)	104	1	8	4	4	8
Kanamicina (5 y 6)	109	5	1	2	2	1
Etionamida (5 y 5)	103	3	11	0	0	11
Ácido p-aminosalicílico (2 y 2)	98	12	2	5	5	2
Ácido p-aminosalicílico (2 y 10)	98	5	2	12	12	2
Amikacina (4 y 6)	109	6	1	0	0	1
Ciprofloxacina (2 y 1)	112	1	3	1	1	3

Sensibles (S), resistentes (R), verdaderos negativos (VN), verdaderos positivos (VP), falsos negativos (FN) y falsos positivos (FP).

Tabla 8 . Sensibilidad, especificidad y valores predictivos del método de sensibilidad con discos comparado con el método radiométrico, a los antibióticos de primera línea.

Las concentraciones críticas usadas en el método radiométrico y el método convencional, respectivamente, fueron: estreptomina 6 y 10 µg/ml; isoniacida 0.1 y 0.2 µg/ml; rifampicina 2 y 1 µg/ml y etambutol 7 y 5 µg/ml.

Método convencional	Método radiométrico		%			
	S	R	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Estreptomina	S	100 4	96.15	69.23	96.15	69.23
	R	4 9				
Isoniacida	S	78 3	96.30	91.67	96.30	91.67
	R	3 33				
Rifampicina	S	84 2	92.31	92.31	97.67	77.42
	R	7 24				
Etambutol	S	92 1	82.14	80	98.92	16.67
	R	20 4				

Valores predictivos positivos (VPP) y valores predictivos negativos (VPN)

PATRÓN DE SUSCEPTIBILIDAD DE AISLADOS CLÍNICOS POR MÉTODO RADIOMÉTRICO:

Tabla 9. De acuerdo a la resistencia que presentó cada aislado clínico, se dividieron en monorresistentes y multirresistentes.

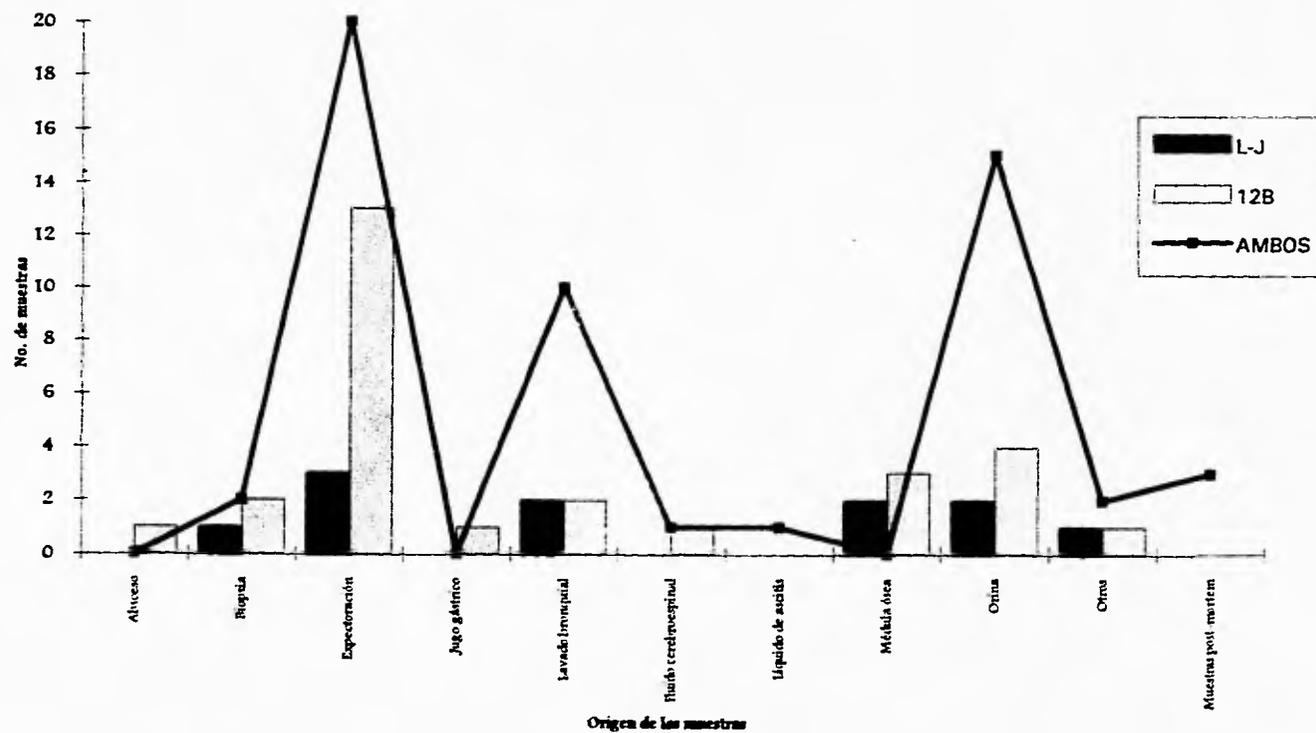
Patrón de susceptibilidad	Antibiótico	No. de aislados	%
Sensibles		77	65.8
Monorresistentes		10	8.5
	Isoniacida	6	5.1
	Rifampicina	1	0.8
	Estreptomicina	3	2.5
	Etambutol	0	0
Multirresistentes		30	25.6
Dos antibióticos		22	18.8
	Isoniacida+Rifampicina	17	14.5
	Isoniacida + Estreptomicina	4	3.4
	Isoniacina + Etambutol	1	0.8
Tres antibióticos		6	5.1
	Isoniacida + Rifampicina + Estreptomicina	4	3.4
	Isoniacida + Rifampicina + Etambutol	2	1.6
Cuatro antibióticos	Isoniacida + Rifampicina + Estreptomicina + Etambutol	2	1.6

Tabla 10. Patrón de resistencia antimicrobiana de 25 aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* con resistencia combinada a isoniacida y rifampicina.

Antibiótico	No. de aislados	%
Estreptomicina	6	24
Kanamicina/amikacina	5	20
Acido p-aminosalicílico*	5	20
Etambutol	4	16
Etionamida	3	12
Tiacetazona	3	12
Amoxicilina/clavulanato	2	8
Ciprofloxacina	1	4
Ofloxacina	0	0

*Cepas moderadamente sensibles por método radiométrico.

Número de cultivos positivos de Mycobacterium sp obtenidos en cada medio.



GRÁFICA 3

Especies de micobacterias obtenidas en los diferentes medios de cultivo utilizados

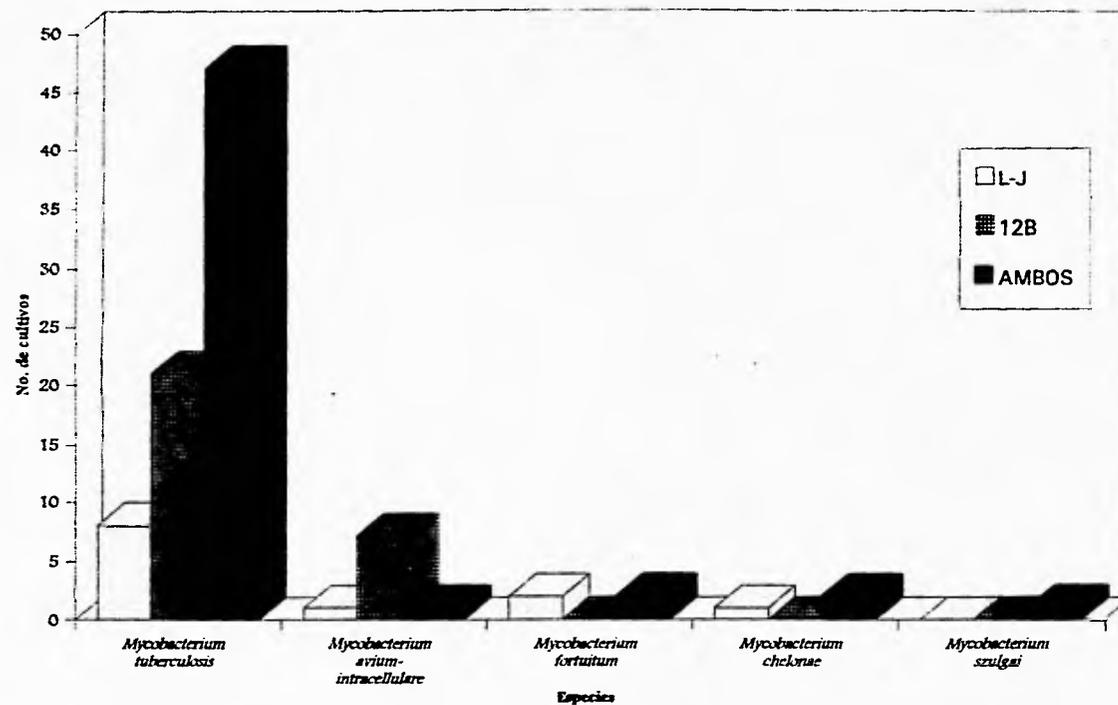
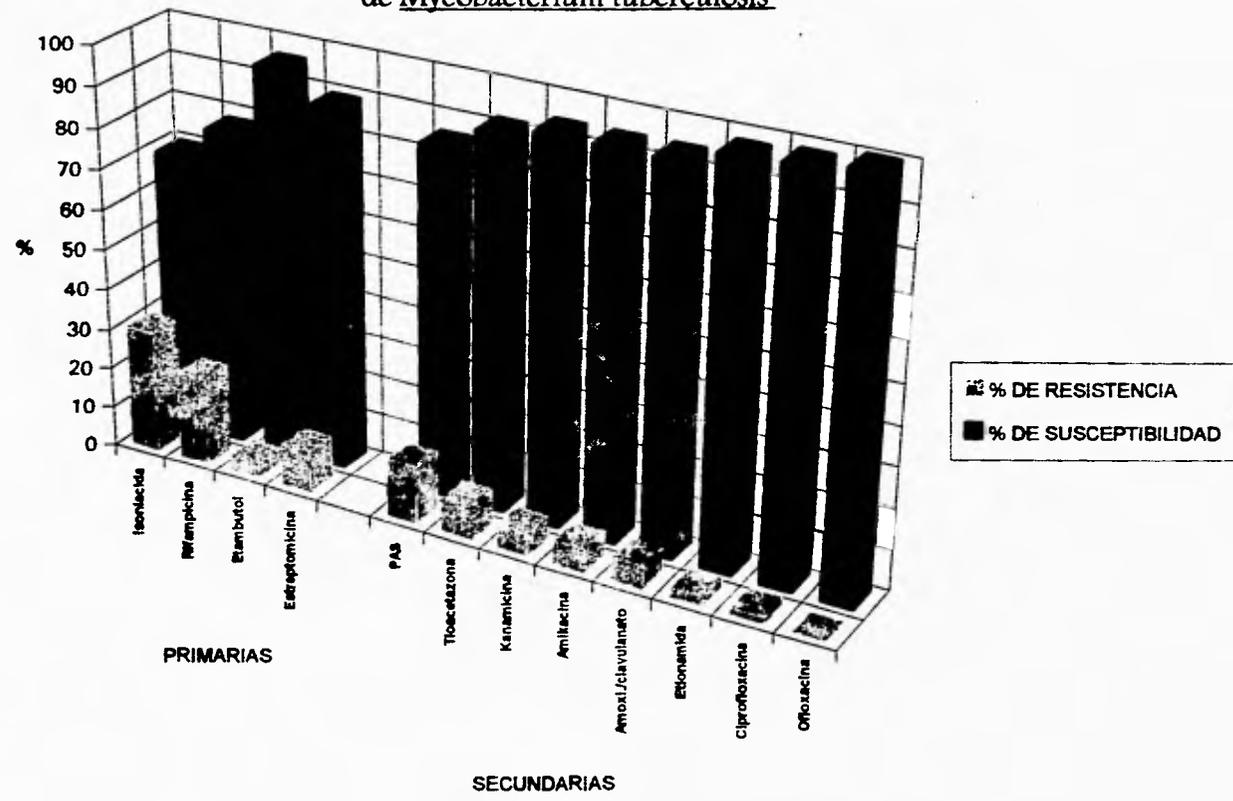


GRÁFICO 4

PAGINACION VARIA

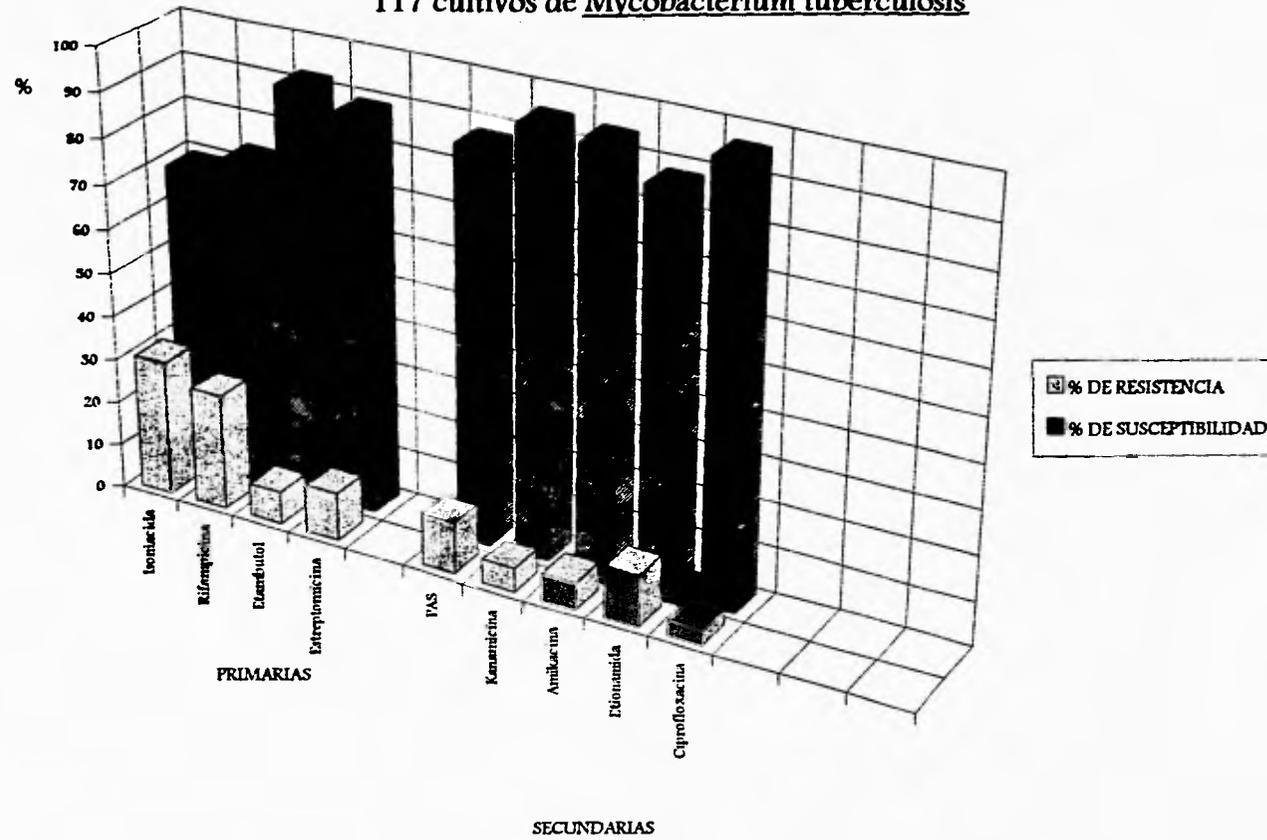
COMPLETA LA INFORMACION

Patrón de sensibilidad antimicrobiana determinada por el método radiométrico en 117 cultivos de Mycobacterium tuberculosis



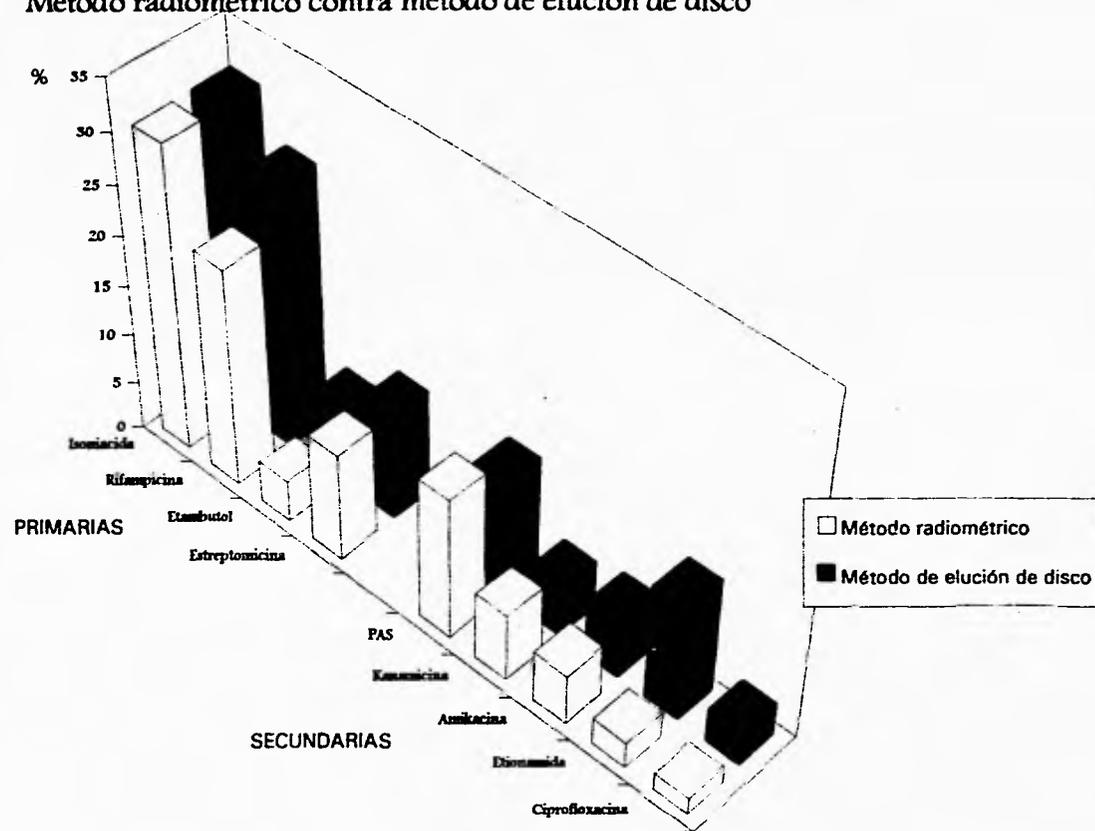
GRAFICA 5

**Patrón de sensibilidad antimicrobiana determinada por el método de elución de disco en
117 cultivos de Mycobacterium tuberculosis**



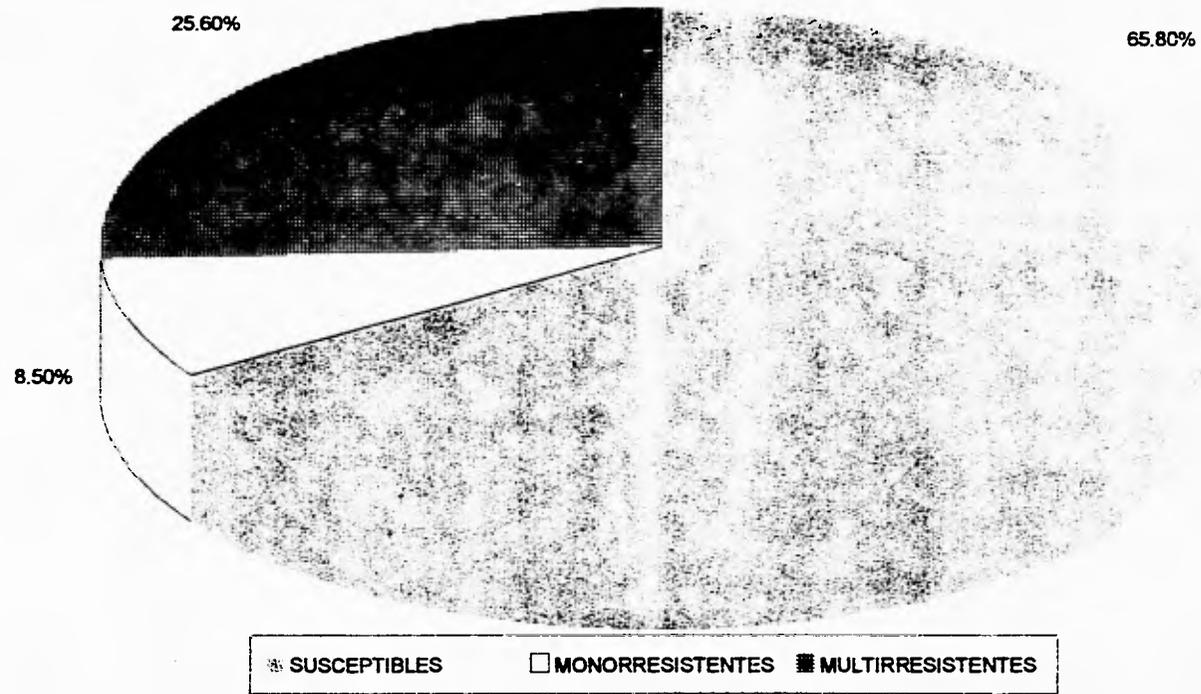
GRÁFICA 6

Porcentaje de cultivos resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* aislados de muestras clínicas.
Método radiométrico contra método de elución de disco



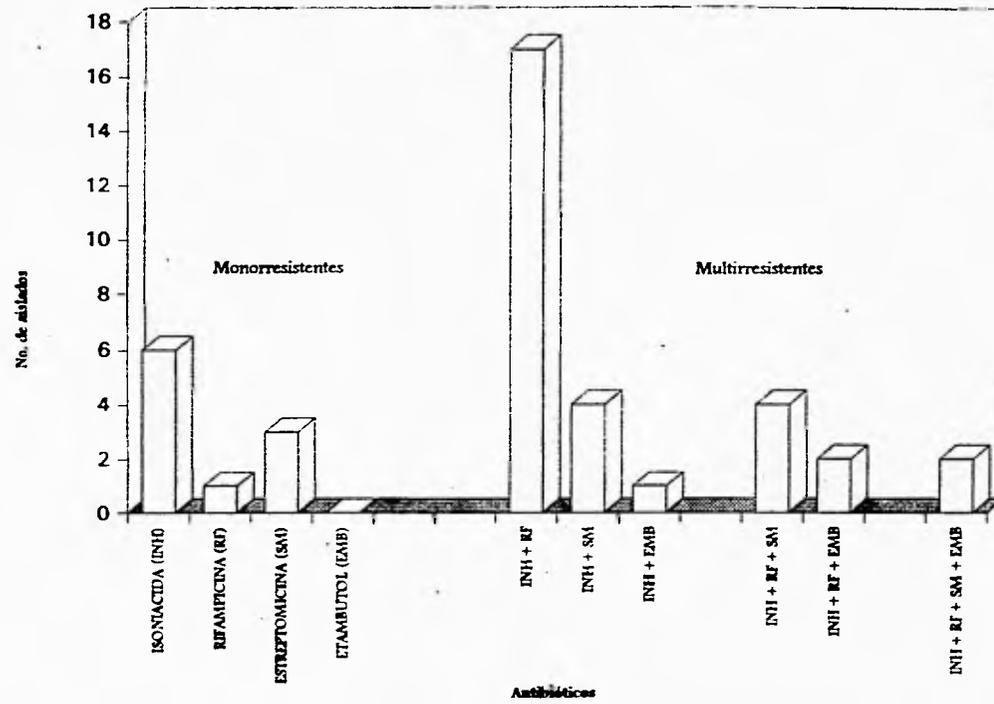
GRÁFICA 7

Patrón de sensibilidad en 117 aislados clínicos de Mycobacterium tuberculosis. Método radiométrico



GRAFICA 8

Patrón de resistencia en 117 aislados clínicos de Mycobacterium tuberculosis. Método radiométrico



GRAFICA 9

9. DISCUSIÓN

Nuestros resultados indican que el método radiométrico es mucho más sensible que el método convencional para detección de cultivos positivos de *M. tuberculosis* y *M. avium-intracellulare*, tal como ha sido reportado por otros investigadores (12,41). El porcentaje de 88.7 % de cultivos positivos obtenidos por el medio 12B y de 69.88 % por el medio LJ, indiferentemente de la especie aislada, es similar al obtenido por Kallo y cols. (41), quienes reportaron el desarrollo del 89.4 % de cultivos positivos por el medio 12B y de 69 % por el medio LJ y ligeramente menor al de Park y cols. (58), quienes reportaron una detección del 93 % de cultivos positivos usando el medio 12B y de 82 % por el medio LJ. Por otra parte, Kiehn y Cammarata (43), reportaron la detección de 79 % de cultivos positivos de *M. tuberculosis* usando el medio 12B y de 76 % por el medio LJ, nuestros resultados fueron similares ya que 89.84 % de cultivos positivos identificados como *M. tuberculosis*, desarrollaron en el medio 12B mientras que 72.5 % desarrolló en el medio LJ. En cuanto al complejo *M. avium-intracellulare*, obtuvimos el desarrollo de 88.89 % cultivos positivos por el medio 12B el cual fue mayor que el obtenido por Kirahara y cols. (44) quienes reportaron 74 % y que el 83 % reportado por Kiehn y Cammarata(43) mientras que por el medio LJ sólo se obtuvo el 22.22 % de cultivos positivos de esta especie.

Algunos estudios han demostrado la marcada reducción del tiempo necesario para la detección de cultivos positivos de micobacterias por el método radiométrico (medio 12B)(12,33,55,41), en este estudio encontramos que el tiempo promedio para la detección de cultivos positivos por medio 12B fue de 14.98 días mientras que para el medio LJ, fue de 28.95 días.

Las micobacterias son consideradas microorganismos de difícil crecimiento que requieren muchos nutrientes para su desarrollo. Al cultivar una muestra en medio sólido, el microorganismo requiere mucho tiempo para crecer porque tiene mayor dificultad para tomar los nutrientes del medio de cultivo hasta formar una colonia visible para su detección, requiriéndose así más tiempo de desarrollo para poder hacer un frotis de la colonia observada.

El medio 12B es un medio líquido que favorece el contacto del microorganismo con los nutrientes presentes en el medio de cultivo, la detección radiométrica es tan sensible que sólo se requiere un IC a partir de 100 para poder realizar un frotis y considerar un cultivo como positivo, por lo que el desarrollo se detecta en menos tiempo. Las desventajas del medio líquido son el hecho de no poder realizar la prueba de niacina a partir de dicho medio, ya que no contiene el sustrato necesario para que la micobacteria pueda producir niacina, tampoco podemos observar la morfología de las colonias ni la producción o carencia de pigmento siendo estos necesarios para la identificación de la especie (45,78).

Tuvimos 3 aislados que fueron identificados como *M. tuberculosis* por pruebas bioquímicas y como otras micobacterias mediante la prueba de NAP. Esto probablemente fue debido a que los aislados estaban contaminados con bacilos o cocos por lo que se tuvo que purificar el cultivo, se repitieron ambos métodos y se identificaron dichos aislados como *M. tuberculosis*. Por lo tanto es muy importante corroborar que el cultivo esté puro, sembrando una gota del cultivo en GSC, e incubándolo a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 hrs en atmósfera de 5% de CO_2 , antes de realizar alguna de las pruebas de identificación y de

sensibilidad, ya que en este último caso podría presentar resistencia debida a un contaminante.

La ventaja de la prueba de NAP radica en que nos permitió realizar la identificación en menos tiempo, mostrando una alta sensibilidad y especificidad para diferenciar cepas del complejo *M. tuberculosis*, del resto de las especies como se ha reportado anteriormente (26,55,41,70). Esto permite al clínico orientarse en cuanto al tratamiento que deberá emplear en el paciente ya que éste varía cuando se trata de una infección por otras micobacterias que no pertenecen al complejo tuberculosis. Por otro lado se ha reportado que la prueba de NAP, no es independiente de la prueba de niacina (26,48) ya que con esta última podemos diferenciar cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Aunque se utiliza el mismo tratamiento en ambos casos, su identificación es útil para estudios epidemiológicos.

La desventaja de la prueba de NAP fue que la identificación se considera presuntiva ya que se debe confirmar mediante pruebas bioquímicas convencionales.

Finalmente, el tiempo requerido para hacer la identificación por prueba de NAP, fue de 2 a 4 días de incubación y de tres semanas por pruebas bioquímicas (45,78), ya que para realizarlas se requiere de un cultivo fresco, abundante, desarrollado en medio LJ (26,41,55). Aunque este método de identificación se utilizó para corroborar la prueba de NAP, no es el mejor, ya que actualmente la tecnología y los métodos de biología molecular pueden hacer identificaciones más precisas y en menos tiempo (10,47,62).

Todos los métodos nuevos deben ser comparados con los métodos convencionales. Esto resulta difícil, cuando los métodos convencionales no están bien estandarizados (68).

Los principios básicos del método radiométrico han sido establecidos y es un método bien estandarizado (7,33,42,68,69,91). Este estudio se realizó para comparar los resultados de la sensibilidad en cepas de *M. tuberculosis* y poder establecer las concentraciones de antibióticos necesarias para la obtención de resultados uniformes.

En relación a los 4 antibióticos de primera línea que fueron probados, los resultados con etambutol y estreptomina mostraron algunas diferencias entre los métodos utilizados, como se ha reportado anteriormente (68). Los factores que pudieron haber contribuido, son:

- a) Diferencias en la actividad del antibiótico de acuerdo al medio de cultivo utilizado,
- b) Una baja proporción de microorganismos resistentes al antibiótico en la población del cultivo probado,
- c) La manipulación de las cepas en cada uno de los métodos debido a que por el método convencional para ajustar una cepa al estándar no. 1 de Mc Farland, se comparó el tubo problema, con el tubo no. 1 del estándar de Mc Farland, a simple vista; este ajuste tiene un alto riesgo de error humano,
- d) La disminución de la potencia del antibiótico probado, usando el método del disco, ya que requiere de un largo período de incubación a 37° C.

Sin embargo, dichas diferencias podrían disminuir ajustando las concentraciones de los antibióticos de acuerdo al método utilizado (68).

Para estreptomina, podemos observar que las concentraciones de 6 µg/ml en el método radiométrico y la de 10 µg/ml por el método de disco, son las que presentan los resultados más parecidos en ambos métodos. De acuerdo a los estudios realizados por otros investigadores (68), se ha visto que la estreptomina es más activa en medio de caldo

presentando mayor susceptibilidad que por el método de disco. Otros estudios han mostrado que la CIM de estreptomicina en el medio de caldo, es aproximadamente la mitad de la CIM de estreptomicina en el medio sólido, para *M. tuberculosis* (68). Debido a esto, se requiere probar varias concentraciones por ambos métodos para ajustar los resultados obtenidos.

Con respecto al etambutol, la variación de los resultados, siempre ha mostrado un gran problema en estudios de susceptibilidad *in vitro*, especialmente cuando se utilizan bajas concentraciones (68). Las dos concentraciones de etambutol usadas por el método de disco, presentan grandes diferencias, comparado con el método radiométrico. Las diferencias entre ambos métodos al utilizar etambutol podrían reducirse probando más concentraciones del antibiótico en cada método. En el estudio realizado, las concentraciones de 7 µg/ml en el método radiométrico y de 5 µg/ml en el método de disco fueron las que presentaron los resultados más parecidos. Las diferencias mostradas por etambutol en ambos métodos, podrían ser debido a la pérdida de actividad del antibiótico en el medio 7H11. Sin embargo, las diferencias mostradas indican que las concentraciones usadas no son comparables (68).

Las dos concentraciones utilizadas para rifampicina y la de 6 µg/ml por el método radiométrico y 10 µg/ml en el método de disco, para isoniacida, mostraron una buena correlación por ambos métodos.

El intervalo requerido por el método radiométrico para las pruebas de sensibilidad reportado por otros es de 4 a 10 días (23,61,68,69,70). Sin embargo, nosotros observamos que depende del tamaño del inóculo. Cuando el inóculo fue poco denso o poco viable, tomó más de 4 días para reportar el resultado mientras que cuando el inóculo fue demasiado denso (IC del control mayor de 30 antes del día 4), los resultados no se pudieron interpretar

claramente. De acuerdo a esto, es esencial utilizar cepas viables y viales con el IC recomendado por el método (IC=500-800) para obtener resultados en el tiempo apropiado para no invalidar la prueba (69,70). Por otro lado, al probar el método con cultivos directos (primocultivos) con IC=500-800 y con subcultivos con IC=500-800, en caso de cultivos líquidos, observamos que en el segundo caso, el resultado se obtiene en menos tiempo ya que el cultivo quedó adaptado a las nuevas condiciones del medio. Así mismo, otros autores (70) sugieren utilizar este método para cultivos desarrollados en medio sólido ajustando el cultivo a una concentración de estándar no. 1 de Mc Farland el cual corresponde a un IC=500-800 pero nosotros observamos que es preferible hacer un subcultivo a partir del medio sólido al medio líquido y hacer la prueba de sensibilidad con un IC=500-800 ya que se elimina error humano en el ajuste de la concentración de microorganismos. En cuanto al método de disco, se requirió de un período de 3 semanas de incubación antes de poder reportar los resultados (23,24,61,68,69,70,85). En este caso, el ajuste se hizo a partir de un subcultivo en medio sólido y la concentración de bacterias se determinó utilizando el estándar no. 1 de Mc Farland el cual tiene mayor posibilidad de error.

Es importante enfatizar, en vista de las diferencias mostradas por uno u otro método, que el método radiométrico detecta organismos verdaderamente sensibles, mientras que el método por disco detecta verdaderos resistentes. Estas diferencias pueden atribuirse a cultivos poco homogéneos de la bacteria en el inóculo, el cual es crítico para el método por disco. Es posible que el método radiométrico sea más sensible debido a que el medio líquido permite mayor contacto entre los microorganismos y el antibiótico y un período corto de incubación con lo que se evita la disminución en la potencia del antibiótico probado (69).

Este trabajo apoya la hipótesis de que el reporte de sensibilidad de *M. tuberculosis*, puede ser obtenido en forma más rápida usando un cultivo fresco y cepas control.

Para kanamicina, amikacina y ciprofloxacina, se utilizaron concentraciones que detectan cepas moderadamente sensibles según los autores que han determinado la CIM para micobacterias (39) obteniendo en cada método resultados semejantes.

La concentración utilizada para etionamida detectó las cepas moderadamente resistentes (39) por el método radiométrico. La diferencia es muy notable si comparamos los resultados obtenidos por el método de disco y el método radiométrico, por lo que sugerimos utilizar mayores concentraciones del antibiótico en medio sólido.

En cuanto al ácido p-aminosalicílico, no se tienen datos de la concentración que se deba utilizar para detectar cepas sensibles o resistentes. Los resultados menos discrepantes se observaron usando una concentración de 2 µg/ml en ambos métodos, pero al contrario de lo que esperábamos, se observa que el método de disco presenta mayor número de cepas sensibles aún usando la misma concentración y tomando en cuenta que estamos utilizando el medio sólido por lo que esperaríamos menor difusión del antibiótico en el medio y por lo tanto menor cantidad de cepas sensibles por el método de disco. Para estos dos últimos antibióticos se sugiere realizar pruebas de sensibilidad a un mayor número de aislados y probar diferentes concentraciones en cada uno de los métodos utilizados. Aún se desconoce el modo de acción de este antibiótico, y sólo se cree que inhibe la síntesis del ácido fólico interfiriendo en la toma y utilización de ácido salicílico, lo cual puede afectar la ruta de transferencia de hierro. Algunos autores reportan resistencia cruzada con Tiacetazona (31). En este estudio solo encontramos un aislado con resistencia a ambos.

De acuerdo al patrón de susceptibilidad del método radiométrico, observamos que la mayor resistencia se encontró para isoniacida (inhibidor en la síntesis de ácidos micólicos) y para rifampicina (inhibidor de la transcripción), como ha sido reportado por otros autores (3,15,80).

Un 24 % de las cepas que fueron resistentes a isoniacida y rifampicina mostraron también resistencia a estreptomina, y un 20 % resistencia tanto a kanamicina como a amikacina. Estos tres antibióticos son llamados inhibidores de translación y su principal modo de acción es inhibiendo la síntesis de polipéptidos mediante un error en la lectura por el ribosoma (16,31). Solo dos de las seis cepas resistentes a estreptomina lo fueron también para kanamicina y amikacina.

Aunque el mecanismo de resistencia para isoniacida, etionamida y tiacetazona es semejante (1,31,37), sólo 1 cepa fue resistente a los tres antibióticos.

En cuanto a los β -lactámicos, se sabe que *M. tuberculosis* presenta resistencia a éstos debido a su producción de β -lactamasa, pero esta acción se puede inhibir utilizando clavulanato en relación 1:1 o 1:2 con el β -lactámico (31). Se tiene el reporte de dos casos de pacientes infectados con cepas resistentes a los antibióticos de primera línea, a los cuales se les dio un tratamiento a base de amoxicilina-clavulanato presentando mejoras significativas (56). Por tal motivo, consideramos de suma importancia realizar pruebas de sensibilidad a este antibiótico en los casos de cepas multirresistentes. En este estudio sólo se encontraron dos cepas resistentes a amoxicilina-clavulanato que también lo fueron para isoniacida y rifampicina.

Las quinolonas más efectivas usadas en el tratamiento contra tuberculosis son ciprofloxacina y ofloxacina que tienen un efecto importante pudiendo reducir en gran cantidad el número de bacilos tuberculosos arrojados en la expectoración (31). Para estos antibióticos encontramos solo una cepa resistente a ciprofloxacina.

Con este análisis podemos mostrar la relación en la acción de los antibióticos probados ya que se presentó resistencia en algunas de las cepas cuando el modo de acción del antibiótico en el microorganismo era semejante.

Este patrón nos muestra la elevada resistencia que hay para isoniacida y rifampicina. Actualmente, debido a la coinfección entre SIDA y tuberculosis, se ha incrementado dicha resistencia a nivel mundial (3,11,12,15,63,73,75,74,94) marcando de modo significativo, la importancia de realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* antes de iniciar un tratamiento para evitar el aumento de resistencia ya que se ha comprobado que en el caso de cepas resistentes, no se logra la curación; esto trae como consecuencias un aumento en las tasas de mortalidad y un aumento potencial en la diseminación del microorganismo. Así mismo, es importante aclarar que se requiere realizar más estudios epidemiológicos que muestren los patrones de susceptibilidad en la población mexicana.

10. CONCLUSIONES.

Para la recuperación de cepas se deben utilizar ambos medios de cultivo, ya que hay especies de importancia clínica que se recuperan mejor en uno que en otro proporcionando un rendimiento más alto utilizando ambos medios.

La identificación de especies de micobacterias es más rápida por el método de NAP pero no se puede considerar como definitiva por lo tanto se debe confirmar por pruebas bioquímicas reportando la identificación por NAP como presuntiva.

El método radiométrico para la determinación de sensibilidad proporciona los resultados en menos tiempo que el método por disco.

Para los antibióticos de primera línea, existe correlación entre los dos métodos probados aunque, para estreptomycin y etambutol se deben probar más concentraciones por el método de disco.

Los resultados obtenidos para los antibióticos de segunda línea, tienen correlación en ambos medios excepto en el caso del ácido p-aminosalicílico, para el cual se sugiere probar más concentraciones por ambos métodos.

El patrón de susceptibilidad en nuestra población muestra elevada resistencia a isoniacida y rifampicina y resistencia combinada con el resto de los antibióticos probados.

11. BIBLIOGRAFIA.

- 1) Alford RH. 1990. Antimycobacterial Agents. En: Mandell/Douglas/ Benett. Eds. Principles and practice of infectious diseases. 3rd. edicion. Vol. 1 350-360. Churchill Living Stone Inc, NY
- 2) Alpizar BC. 1992. Aspectos epidemiológicos sobre la tuberculosis. Tesis Profesional. Facultad de Química. UNAM.
- 3) Altamirano M, Marostenmaki J, Wong A, FitzGerald M, Black W A and Smith J A. 1994. Mutations in the Catalase-Peroxidase Gene from Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. J. Infec. Dis. 169:1162-1165.
- 4) American Thoracic Society and Centers for Disease Control. 1990. Diagnostic standars and classification of tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 142:725-735.
- 5) Bannister E R, Condon E V and Manos J P. 1985. Comparision of detection, Identification and Drug Susceptibility Testing of Mycobacteria by Using the BACTEC Radiometric Method and Conventional Methods. Abs. Annual Meeting of Asm. Las Vegas, NV.
- 6) Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, Rist N and Smelev NA. 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis programmes, Bull WHO. 41:21.
- 7) Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler HT, Meissner G, Mitchison DA and Sula L. 1963. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance, Bull. WHO. 29:565.
- 8) David HL, 1971. Fundamentals of drug susceptibility testing in tuberculosis, Atlanta, Centers for Disease Control, PHS, HEW (HEW publication no. 00-2165).
- 9) Deland FH and Wagner HN. 1969. Early detection of bacterial growth with carbon-14 labelled glucose, Radiology. 92:154-157.
- 10) Ehlers S, Pirmann M, Zaki W, Hahn H. 1994. Evaluation of a Commercial rRNA Target Amplification Assay for Detection of *M. tuberculosis* complex in Respiratory Specimens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 13(10):827-829.
- 11) Ellner J J, Hinman A R, Dooley S W, Fischl M A, Sepkowitz K A, Goldberger M J, Shinnick T M, Iseman M D and Jacobs Jr W R. 1993. Tuberculosis Symposium: Emerging Problems and Promise. J. of Infec. Dis. 168:537-551.

- 12) Ellner P D, Kiehn T E, Cammarata R and Hosner M. 1988. Rapid Detection and Identification of Pathogenic Mycobacteria by Combining Radiometric and Nucleic Acid Probe Methods. *26(7):1349-1352.*
- 13) Evans KD, 1992. Nakasone AS, Sutherland PA, de la Maza LM, Peterson EM. 1992. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-M. intracellulare* directly from primary BACTEC cultures by using acridinium-ester-labeled DNA probes. *Journal of Clinical Microbiology. 30: 2427-2431.*
- 14) Ferreira E. y Velázquez O. 1993. Tuberculosis en México: otro Emisario del pasado. *Epidemiología, Sist. Nal. de Salud. 8(7):97-103.*
- 15) Frieden T R, Sterking T, Pablos-Mendez A, Kilburn J O, Cauthren G M and Dooley S W. 1993. The Emergence of Drug-Resistant. Tuberculosis in Nex York City. *New Eng. J. Medicine. 328(8):521-526.*
- 16) Friedman LN. 1994. Tuberculosis. Friedman LN. CRC Press. USA.
- 17) Fox GE, Stackebrandt E. 1987. The aplication of 16SrRNA cataloguing and 5S rRNA sequencing in bacterial systematics. En: Colwell R, Grigorova R. *Methods in microbiology. Vol 19. Academic Press, London. p 405-458*
- 18) Gelber RH. 1994. Chemotherapy of lepromatous leprosy: recent developments and prospects for the future. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 13: 942-952.*
- 19) Good RC. 1985. Opportunistic pathogens in the genus *Mycobacterium*. *Annual Reviews of Microbiology. 39: 347-369.*
- 20) Good RC, Snider DE. 1982. Isolation of nontuberculosis mycobacteria in the United States. *Journal of Infectious Diseases. 146: 829-833.*
- 21) Good RC. 1992. The genus *Mycobacterium* -medical. En: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Scheleifer KH (edit): *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Springer Verlag, N. York. Vol. 2:1238-1270.*
- 22) Gordon RE, Smith MM. 1955. Rapidly growing acid fast bacteria.II: Species description of *Mycobacterium fortuitum* Cruz. *Journal of Bacteriology 69: 502-507.*
- 23) Graevenitz A von, Koch E and Salfinger M. 1984. Comparision Between Radiometric and Proportional Methodologies in Susceptibility Testin of *Mycobacteria* other than Tubercle Bacilli (MOTT). *J. Microbiol. Met. 3:95-100.*

- 24) Griffith M, Barrett M L, Bodily H L and Wood R M. 1967. Drug Susceptibility Tests for Tuberculosis Using Drug Impregnated Disks. *Am. J. Clin. Path.* **37(5)**: 812-817.
- 25) Griffith M, Matajack M L, Bissett M L and Wood R M 1971. Cooperative Field Test of Drug-Impregnated Discs for Susceptibility. Testing of Mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* **103**: 423-426.
- 26) Gross W M and Hawkins J E. 1985. BACTEC NAP Test for Differentiation of Mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **21**:634.
- 27) Gross W M and Hawkins J E. 1986. Radiometric Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* with Secondary Drugs. Abs. Annual Meeting Am. Soc. Microbiol. Washington, D. C.
- 28) Gross WM, Hawkins JE. 1985. Radiometric selective inhibition tests for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, and other mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology.* **21**: 565-568.
- 29) Guthertz LS, Lim SD, Jang Y, Duftey PS. 1993. Curvilinear-gradient high-performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology.* **31**:521-524.
- 30) Hansen GA. 1880. *Bacillus leprae*. *Virchows Archiv.* **79**:32-42.
- 31) Hartmans S, De bont JAM. 1992. The genus Mycobacterium -nonmedical. En: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Scheleifer KH (de): *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer Verlag, New York. Vol. 2:1214-1237.
- 32) Hawkins JE, 1976. Disc and dilution media for susceptibility testing against primary antituberculosis drugs (abstract), *Am. Rev. Respir. Dis.* **113**:78-80.
- 33) Hawkins J E. 1986. Rapid Mycobacterial Susceptibility Tests. *Clin. Microbiol. Newsletter.* **8(14)**:101-103.
- 34) Heifets L B. 1991. *Drug Susceptibility in the Chemotherapy of Mycobacterial Infections.* CRC Press. Florida.
- 35) Honoré N and Cole S T. 1994. Streptomycin Resistance in Mycobacteria. *Antim. Agents and Chemoter.* **38(2)**:238-242.
- 36) Horsburg Jr. CR, Selik RM: 1989. The epidemiology of disseminated nontuberculosis mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *American Review of Resp. Diseases.* **139**:4-7

- 37) Inderlied C B. 1991. Antimicrobial Agents: Susceptibility Testing and Spectrums of Activity, Mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biological fluids. en: Antibiotics in Laboratory medicine. De. Williams & Wilkins. Baltimore. 3a. edición. 134-195.
- 38) Infante SL. 1994. Patrones de resistencia en *M. tuberculosis*. Tesis Profesional. Fac de Química. Universidad Veracruzana..
- 39) Iseman M D. 1993. Treatment of Multidrug-Resistant Teberculosis. New Eng. J. of Medicine. **329(11)**: 784-791.
- 40) Joklik WK, Willett HP y Amos DB. 1989. *Mycobacterium*. En: Microbiología Médica. Edit. Médica Panamericana. Argentina, Buenos Aires. **33**:635-654.
- 41) Kallo J R and Pulliam L. 1989. The BACTEC Radiometric System for Detection and Rapid Identification of Mycobacteria. Lab. Medicine. **Oct**:692-695.
- 42) Kawa D E, Pennell D R, Kubista L N and Schell R F. 1989. Development of a Rapid Method for Determining the Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Isoniazid Using the Gen-Probe DNA Hybridization System. Antimicrob. Agents Chemother. **33(7)**:1000-1005.
- 43) Kiehn T, Cammarata R. 1986. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. J. Clin. Microbiol. **24(5)**: 708-711.
- 44) Kirahara J, Hillier S, Coyle M. 1985. Improved detection times for *Mycobacterium avium*-complex and *M. tuberculosis* with the BACTEC radiometric system. J. Clin. Microbiol. **22(4)**: 841-845.
- 45) Koneman RGDS and Kim YK. 1991. *Mycobacterium*. En: M of C Balows 5a. edition. Am. Society for Microbiol. Whashington DC. **34**: 304-314.
- 46) Lapage SP. Sneath PHA, Lessel EF, Skerman VBD, Seeliger HPR, Clark WA. 1975. International Code of Nomenclature of bacteria. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 47) La Rocco MT, Wanger A, Ocera H and Macias E. 1994. Evaluation of a commercial rRNA Amplification Assay for Direct Detention of *M. tuberculosis* in Processed Sputum. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **13(9)**:726-731.
- 48) Laszlo A and Eidus L. 1978. Test for differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis* from other mycobacteria. Can. J. Microbiol. **24**:754-756
- 49) Laszlo A, Helbecque D M and Tostowaryk W. 1986. Proficiency testing of radiometric drug susceptibility tests of *M. tuberculosis*. abs. Annual Meeting Am. Soc. for Microbiol (ASM), Washington, D.C.

- 50) Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, Vincent-Lévy-Frèbault V. 1992. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. **30**: 2476-2478.
- 51) Lehmann KB, Neumann R. 1896. Atlas und Grundriss der Bacteriologie und Lehrbuch der speziellen bacteriologischen Diagnostik. JF Lehmann, Munich.
- 52) Levy Frèbault V, Portaels F. 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *International Journal of systematic bacteriology*. **42**:315-323.
- 53) McClatchy JK. 1970. Rapid method of microbial susceptibility testing, *Infect. Immun.* **1**:421-425.
- 54) McClatchy JK. 1978. Susceptibility testing of mycobacteria, *Lab. Med.* **9**:47-51.
- 55) Musial C E and Roberts G D. 1987. Rapid Detection and Identification Procedures for Acid-Fast Organisms. *Clin. Microbiol. Newsletter*. **9**(12):89-92.
- 56) Nadler J P, Berger J, Nord J A, Cofsky R and Saxena M. 1991. Amoxicillin-Clavulanic Acid for Treating Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Chest*. **99**(4):1025-1026.
- 57) Panorama Epidemiológico de la tuberculosis. 1993. Registro Nacional de casos de tuberculosis. Informe mensual de microscopía y cultivo. *Epidemiología*.
- 58) Park C, Hixon D, Ferguson C. 1984. Rapid recovery of mycobacteria from clinical specimens using automatic radiometric technic. *Am. J. of Pathology*. **81**: 341-345.
- 59) Pearson, M.L., 1992. Nosocomial Transmission of Multidrug-Resistant *M. tuberculosis*. A Risk to Patients and Health Care Workers. *Ann. Intern. Med.* **117**:191-196.
- 60) Quemard A, Lacave C, Lancelle G. 1991. Isoniazid inhibition of mycolic acid synthesis by cell extracts of sensitive and resistant strains of *M. avium*. *Antimicrob. Agents and Chem.* **35**:1035-1038.
- 61) Rastogi N, Goh K S and David H L. 1989. Drug Susceptibility Testing in Tuberculosis: A Comparison of the Proportion Methods Using Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 and 7H11 Agar Media and a Radiometric Method. *Res. Microbiol.* **140**:405-417.
- 62) Reinser BS, Gatson AM and Woods GL. 1994. Use of Gene-Probe AccuProbes To Identify *M. avium* Complex, *M. tuberculosis* Complex, *M. kansasii* and *M. goodii* Directly from BACTEC TB Broth Cultures. *J. Clin. Microbiol.* **32**(12):2995-2998.

- 63) Ross B C, Raios K, Jackson K and Dwyer B. 1992. Molecular Cloning of a Highly Repeated DNA Element from *Mycobacterium tuberculosis* and Its Use as an Epidemiological Tool. *J. of Clin. Microbiol.* **30**(4):942-946.
- 64) Runyon EH. 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Medical Clinics of North America.* **43**: 273-290.
- 65) Rüsç-Gerdes S and Jähring A. 1992. Isolierung von Mykobakterien aus Sputum. Vergleich des MB-Checks mit der radiometrischen und der konventionellen Methode. *Pneumologie.* **46**:107-110.
- 66) Salfinger M, Pfyffer GE. 1994. The New Diagnostic Mycobacteriology Laboratory. *Eur. Journal of Clinical Microbiology of Infectious Diseases.* **13**(11): 961-979.
- 67) Sepkowitz KA, Raffalli J. 1994. Tuberculosis at the end of the Twentieth Century. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**(11):902-907.
- 68) Siddiqi S H, Hawkins J E and Laszlo A. 1985. Interlaboratory Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a Radiometric Procedure and Two Conventional Methods. *J. of Clin. Microbiol.* **22**(6):919-923.
- 69) Siddiqi S H, Libouati J P and Middlebrook G. 1981. Evaluation of a Rapid Radiometric Method for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. of Clin. Microbiol.* **13**(5):908-912.
- 70) Siddiqi S H. 1989. Product and Procedure manual. BACTEC TB System. Becton-Dickinson. Maryland.
- 71) Simionatto C, Felton C, Roche J and El-Sadr W. 1993. Epidemiology of Dual Infection with Tuberculosis (Tb) and HIV in Harlem. Abstracts of the 33rd ICAAC.
- 72) Small P M and Moss A. 1993. Molecular Epidemiology and the New Tuberculosis. *Inf. Agents Dis.* 1-6.
- 73) Small P M, Schechter G F, Goodman P C, Sande M A, Chaisson R E and Hopewell P C. 1991. Treatment of Tuberculosis in Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *New Eng. J. Medicine.* **324**(January 31):289-294.
- 74) Small P M, Shafer R W, Hopewell P C, Singh S P, Murphy M J, Desmond E, Sierra M F and Schoolnik G K. 1993. Exogenous Reinfection. With Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Patients With Advanced HIV Infection. *New Eng. J. Medicine.* **328**(April 22):1137-1144.

75) Snider Jr D E and La Montagne J R. 1994. The Neglected Global Tuberculosis Problem: A Report of the 1992 World Congress on Tuberculosis. *J. Infec. Dis.* **169**:1189-1196.

76) Stackbrandt E. 1992. Unifying phylogeny and phenotypic diversity. En: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (edit): *The prokariotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Springer Verlag, New York. Vol. **1**:3-18.

77) Stanley M, Michaud J, Pane J, Martin A, Moschetti S, Jeffery B and Sonner P R. 1991. Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and *Mycobacterium avium* complex Using the BACTEC System and DNA Probes. Abs. Annual Meeting Am. Soc. for Microbiol (ASM), Dallas, Tx.

78) Strong B E and Kubica G P. Isolation and Identification of *Mycobacterium tuberculosis*. A Guide for the Level II Laboratory. HHS Publication No. (CDC) 81-8390.

79) Takift HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreis WB, Cole ST, Jacobs WR and Telenti A. 1994. Clonación y secuencia nucleotídica de los genes *gyr A* y *gyr B* de *M. tuberculosis* y detección de las mutaciones relacionadas a resistencia a quinolonas. *Antim. Agents and Chem.* **38** (4): 773-780.

80) Telenti A, Lowrie D, Matter L, Imboden P, Cole S, Schopfer K, Marchesi F, Colston M J and Bodmer T. 1993. Detection of Rifampicin-Resistance Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* **341**(march):647-650.

81) Tenover F C, Crawford J T, Huebner R E, Geiter L J, Horsburgh, Jr C R, and Good R C. 1993. GUEST COMMENTARY: The Resurgence of Tuberculosis: Is Your Laboratory Ready?. *J. Clin. Microbiol.* **31**(4):767-770.

82) Timpe A, Runyon EH. 1954. The relationship of "atypical" acid-fast bacteria to human disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* **44**:202-209.

83) Volk CA, Benjamin DC, Kadner RJ, Parsons JT. 1988. *Mycobacterium*. En: *Microbiología Médica.* Interamericana Mc Graw-Hill. 3a. edición. **29**:478-484.

84) Wallace Jr R J, Nash D R, Steele L C and Steingrube V. 1986. Susceptibility Testing of Slowly Growing Mycobacteria by a Microdilution MIC Method with 7H9 Broth. *J. Clin. Microbiol.* **24**(6):976-981.

85) Wayne L G and Krasnow I. 1966. Preparation of Tuberculosis Susceptibility Testing Mediums by Means of Impregnated Disks. *Am. J. Clin. Pathology.* **45**(5):769-771.

86) Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackbrandt E, Starr MP, Truper HG. 1987. Report of

the ad hoc committee on the reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **37**: 463-464.

87) Wayne LG, Diaz GA. 1982. Serologic, taxonomic, and kinetic studies of the T and M classes of mycobacterial catalase. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **32**: 296-304.

88) Wayne LG, Kubica GP. 1986. The mycobacteria. En: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (edit.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 1436-1457.

89) Wayne LG. 1981. Numerical taxonomy and cooperative studies: roles and limits. *Reviews of Infectious Diseases*. **3**: 822-828.

90) Wayne LG. 1985. The "atypical" mycobacteria: recognition and disease association. *Critical Reviews in Microbiology*. **12**:185-222.

91) Wilson S, McNemey R, Nye P M, Godfrey-Faussett P D, Stoker N G and Voller A. 1993. Progress toward a Simplified Polymerase Chain Reaction and Its Application to Diagnosis of Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **31**(4):776-782.

92) Woese CR: 1992. Prokaryote systematics: the evolution of a science. En: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (edit): *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. Springer Verlag, New York. Vol. 1:3-18.

93) Yajko DM, Nassos PS, Sanders CA, González PC, Reingold AL, Hoisburgh CR, Hopewell PC, Chin DP, Hadley WK. 1993. Comparison of four decontamination methods for recovery of *M. avium* complex from stools. *J. Clin. Microbiol.* **31**:302-306.

94) Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D and Cole S. 1992. The Catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*. **358**:591-593.

95) Zhang Y, Steingrube V A and Wallace Jr R J. 1992. Beta-Lactamase Inhibitors and the Inducibility of the Beta-Lactamase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**:657-660.

96) Zopf W. 1883. *Die Spaltpilze*, Trewewndt, Breslau.