

00544



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

COMPARACION DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO  
PARA CRIOPRESERVACION A -70° C. PARA SU  
VALORACION Y UTILIZACION EN EL CEPARIO DE  
MICOBACTERIAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE  
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA  
DE LA ESPECIALIZACION EN  
**BIOQUIMICA CLINICA**

**P R E S E N T A:**

**Q. C. JORGE GUILLERMO SOLIS NIETO**

**MEXICO, D.F.**

**2000**



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.

**COMPARACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE  
CULTIVO PARA CRIOPRESERVACIÓN A  $-70^{\circ}$  C.  
PARA SU VALORACIÓN Y UTILIZACIÓN EN EL  
CEPARIO DE MICOBACTERIAS DEL INSTITUTO  
NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.**

# INDICE

RESUMEN

ANTECEDENTES

JUSTIFICACIÓN

OBJETIVOS

GENERALIDADES

PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO

MATERIAL Y MÉTODOS

RESULTADOS

CONCLUSIONES

ANEXO

BIBLIOGRAFÍA

## RESUMEN

Este trabajo se realizó con el fin de encontrar un buen medio para criopreservar micobacterias, principalmente *M. Tuberculosis*, en el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Dicho Instituto no contaba con cepario de micobacterias y surgió la idea de probar tres medios diferentes para congelarlas, los medios utilizados fueron glicerol-agua al 10%, glicerol-7H9 y medio de leche Svelty (utilizado para conservar *pneumococos*), el tiempo que se determinó para hacer dicho estudio fue de 3 meses y la técnica que se realizó fue la siguiente:

Se tomaron las colonias de cultivos positivos de ( + ) y ( ++ ), se hizo una suspensión con solución salina llevándola a una turbidez de 3 en escala de McFarland; posteriormente se diluyó con cada medio de criopreservación en una relación de 1:2 y de ésta dilución se tomaron 0.5 mL y se sembraron en un tubo de cultivo con Lowestein-Jensen, el resto se puso a congelar a - 70 C° durante 3 meses.

Posteriormente se revisaron los tubos de cultivo y se hizo un conteo de las colonias, los datos se guardaron para hacer una comparación con la siembra que se va a obtener después de los tres meses de congelación.

Al descongelar las micobacterias se hizo el mismo procedimiento que antes de congelarlos y se compararon los resultados del primer y segundo cultivo (como se ve en el diagrama de flujo), después se procederá hacer la estadística tomando los porcentajes como números absolutos (lo cuál es válido en control de calidad). Los resultados los veremos más adelante.

Cabe mencionar que en base a este estudio el INER utiliza el medio de glicerol-7H9 para conservar sus micobacterias.

## ANTECEDENTES

Debido a la trascendencia epidemiológica de la tuberculosis es recomendable determinar siempre la susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas aisladas. A pesar de que los conocimientos actuales sobre la tuberculosis han permitido la utilización de técnicas sencillas para el diagnóstico y el empleo de medicamentos con actividad bactericida en el tratamiento, todavía no se han obtenido los logros a los que se podría llegar debido principalmente a fallas de tipo operacional y a las condiciones socioeconómicas de los diferentes países, por esto es necesario obtener ceparios con los cuales se puedan hacer estudios comparativos de susceptibilidad para determinar la resistencia a algún medicamento, poder probar después nuevos medicamentos y determinar si el microorganismo sufre mutaciones (PCR). (1) (2) (7).

## HISTORIA

La tuberculosis ha acompañado como sombra al hombre y a los animales domésticos durante su evolución. En esqueletos que corresponden al neolítico y en momias egipcias, se han encontrado lesiones óseas típicas de tuberculosis. En las comunidades vírgenes ante la enfermedad y que son presa de la misma, se manifiesta en la mayoría de los enfermos como primoinfección aguda con una elevada tasa de mortalidad.

Cuando la tuberculosis se instala por largo tiempo en la comunidad, la primoinfección tiende a curar espontáneamente y la alta mortalidad aparece durante la fase crónica.

Por mucho tiempo, estas dos fases se consideraron de diferente origen: mientras que la primoinfección se suponía infecciosa, la tuberculosis crónica se designaba como hereditaria. Así en la literatura de tipo romántico se sublimaba al enfermo crónico como víctima de un padecimiento hereditario (Dumas, La dama de las Camelias).(4) (10)

Laennec fue quien primero consideró ambas fases como la misma enfermedad; Villemin en 1865 demostró la infectividad del microorganismo al

inocular animales de laboratorio con material proveniente de lesiones de enfermos en ambas fases, desarrollándose la enfermedad. Roberto Koch en 1882 demostró y cultivó al microorganismo. Waksman en 1944 descubrió la estreptomycin, misma que Hinshaw y Feldman aplicaron como tratamiento. Lehman descubrió el ácido para-aminosalicílico también utilizado en el tratamiento de la tuberculosis.

En 1951 tres grupos de químicos descubrieron simultáneamente por separado la isoniacida, que ha sido el fármaco más eficaz contra esta enfermedad y en 1970 se probó la eficacia de la rifampicina.

En algunos pasajes de la antigua literatura Hindú y China, y en el antiguo testamento se encuentran descripciones de los signos y síntomas característicos de la tuberculosis. Los griegos la llamaban "tisis o consunción". De hecho, la medicina hipocrática describió y clasificó muchas enfermedades, entre ellas, la tisis.

Galeno consideraba que la tisis era transmisible y recomendaba, como en el caso de la lepra, el aislamiento de los enfermos. En el siglo XVI Fracastorius describió, con increíble precisión para su tiempo, el contagio intrafamiliar de la tisis; su famoso libro *De Contagione* publicado en 1546, postula que ciertas enfermedades son transmitidas, por partículas imperceptibles a las que denominó *seminatia contagiorum* o "semillas de enfermedad".

En un libro publicado en 1985, "Enfermedades Viejas y Enfermedades Nuevas", Ruy Pérez Tamayo relata cómo esta enfermedad tuvo no solo una gran incidencia en la edad media sino también una gran importancia social. En el capítulo dedicado a la tuberculosis Pérez Tamayo describe cómo "el mal del rey" (una forma de la tuberculosis que afecta a los ganglios del cuello que se conoció, como escrófula), Se relata que mediante "el tocamiento del rey". - Yo te toco Dios te cura -, los enfermos se curaban. Estas fueron las palabras que muchos reyes desde el siglo VI hasta el XVIII, pronunciaban ante largas filas de enfermos en ceremonias especialmente preparadas para ello que permitían al monarca en turno demostrar al pueblo el origen divino de su reinado. (4) (10) (16) (20)

Muchos hombres importantes murieron a causa de la tuberculosis: San Francisco de Asís, Moliere, Chopin, Paganini, Laënnec, Schiller, Chéjov, Weber, entre otros, fueron víctimas de esta implacable enfermedad.

En el campo de la medicina mencionaremos algunos hallazgos importantes en la evolución del conocimiento de la tuberculosis, como los de Richard Mortón que describió la lentitud de la enfermedad; Théophile Bonet, comparó las lesiones encontradas en la tuberculosis generalizada con los granos de mijo y las denominó "tubérculos miliares"; Bayle, en 1793 reconoció a los tubérculos como

una lesión propia de la tuberculosis, y no simplemente como una inflamación ganglionar. Laënnec, al desarrollar la auscultación, permitió la diferenciación entre la tuberculosis y otras enfermedades. Villemin, en 1865, comprobó la transmisibilidad de la tuberculosis al inocular un tejido o exudado en las lesiones tuberculosas en conejos y demostrar la presencia de lesiones tuberculosas en diversos órganos de estos animales, por lo que concluyó que la tuberculosis es una enfermedad específica cuya causa reside en un agente inoculable.

Siguiendo los experimentos de Villemin, Cohnheim, uno de los grandes amigos y protectores de Koch, inoculó fragmentos de tejido tuberculoso en la cámara frontal del ojo en conejos. Sus experimentos le permitían ver dentro del ojo el desarrollo de las lesiones, como si lo hiciese a través de una ventana.

Koch seguía de cerca los resultados de su protector y recordaba las enseñanzas de su maestro en la facultad de medicina Jacob Henle. Este afirmaba que para que un microorganismo pudiera ser considerado como causa de una enfermedad en el hombre debería encontrarse sistemáticamente en los individuos enfermos, ser aislado y utilizado para reproducir la enfermedad en otros individuos.

Por otra parte, Koch consideraba que la importancia de una enfermedad se relacionaba directamente con el número de víctimas que producía. Por ello, las enfermedades infecciosas tenían una gran relevancia. Entre ellas, la tuberculosis cobraba más víctimas que el cólera asiático o la peste bubónica. Las incipientes estadísticas de mediados del siglo XIX mostraban que una séptima parte de la humanidad moría de tuberculosis, y si los números se concentraban en los individuos económicamente activos la tasa se elevaba hasta alcanzar el 30% de esta población.(4)

## JUSTIFICACIÓN

En la última década se ha podido observar que la incidencia de tuberculosis pulmonar en *datos reales* no ha variado mucho puesto que poco se ha podido hacer en la lucha contra esta enfermedad la cual es infecto-contagiosa, se transmite fácilmente y sin tratamiento puede ser mortal.(5)

Según el artículo de tuberculosis epidemiology and control in Veracruz México, la prevalencia de tuberculosis en la república Mexicana es de 18.2 por cada 100,000 habitantes, estos datos son alarmantes puesto que no son reales porque existen casos que aun no se han reportado y que son muchos debido a que hay lugares alejados que no tienen como reportar cada caso que se va detectando o simplemente no son detectados. Por eso la Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación de Mortalidad de la Secretaría de Salud en México tiene un calculo estimado que existen aproximadamente 51.7 casos por cada 100,000 habitantes; un dato aun más alarmante puesto que no se puede luchar contra una enfermedad que en datos exactos no sabemos la magnitud de su prevalencia.(5) (20)

Para poder estudiar a las micobacterias se tienen que estudiar desde un punto de vista bioquímico y esto se puede hacer únicamente con nuevas técnicas y añadirlas a las que ya conocemos, con la implementación de un cepario donde se pueden conservar micobacterias por un tiempo considerable, y así poder ir a la vanguardia de los estudios sobre dichas micobacterias.(7)

Se sabe que las micobacterias conservadas a  $-70^{\circ}$  C. retienen el 100% de su viabilidad y, mantienen propiedades taxonómicas, serológicas, inmunológicas y patogénicas. Sin embargo, para obtener una cepa y que conserve todas sus características y propiedades hay que tener mucho cuidado desde que se obtienen del primocultivo puesto que al ser manipuladas a temperatura ambiente, las suspensiones de todas las micobacterias hacen que éstas pierdan su viabilidad y las más severamente afectadas son aquellas especies cuyo rango de temperatura de crecimiento es estrecho como sucede con *M. tuberculosis* y *M. bovis* (que son las que más afectan al hombre). A pesar de ésta pérdida, todas las cepas vivas retienen sus propiedades taxonómicas definitivas. el mejor método para conservar a las micobacterias, es probablemente el de liofilización de éstas.(8) (9) (11)

## **OBJETIVOS**

Comparar 3 diferentes medios para criopreservar cepas de micobacterias en el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Evaluar el comportamiento de las micobacterias en cuanto a la conservación de su viabilidad después de someterlas a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Obtener un buen medio de criopreservación para poder hacer estudios comparativos posteriores.

# GENERALIDADES

## TUBERCULOSIS

El género *Mycobacterium* está ubicado taxonómicamente en el manual de Bergey de bacteriología sistemática en la sección 16.

Familia *Mycobacteriaceae*,  
Género *Mycobacterium*.

Este género está constituido por 54 especies, son bacterias en forma de bastón que raramente tienen ramificaciones, no esporulados, miden de 2 a 6 micras de largo y de 0.3 a 0.6 micras de ancho, aerobios estrictos, inmóviles y son procariotas. *M. tuberculosis* es la especie tipo y su estructura se describe a continuación. Las demás especies tienen características semejantes. (2) (3) (6)

La pared celular contiene lípidos que constituyen el 20% de peso seco de la bacteria; es una estructura compleja compuesta de 4 capas, la más interna de mureína o peptidoglicanos, que como en otros géneros da a la bacteria forma y rigidez. Por encima de esta capa están las otras 3 diferentes, compuestas de complejos péptidos, polisacáridos y lípidos que semejan filamentos arreglados en una matriz más homogénea. Esta estructura de la pared bacteriana ha sido demostrada por criofractura, la estructura más externa por lo general son peptidogluolípidos denominados mucósidos. (12) (18)

Los principales lípidos que se encuentran en estos microorganismos son ácidos micólicos, glucolípidos, sulfolípidos y cera D.

La pared bacteriana rígida está constituida por una estructura covalente de dos polímeros unidos entre sí, una peptidoglicana y arabinogalactano, contenidos aproximadamente en igual proporción y el 50% del contenido de lípidos son ésteres de ácidos micólicos (ácidos grasos ramificados de 50 a 90 átomos de carbono) y un 25% son ácidos grasos normales.

También se han demostrado glucanomanana y arabinomanana, ésta última parece participar en la patogenicidad de la enfermedad.

Se tiñe con facilidad mediante la técnica de Ziehl Neelsen (fucsina fenicada con calor) y no es fácil que se decolore, aún con alcohol ácido (tienen la propiedad de ácido alcohol resistencia).

Esta enfermedad infecciosa, necrosante, caracterizada por la formación de granulomas nodulares caseosos, que evolucionan en forma fibrosa, ulcerosa o se calcifican, es producida por dos especies del género *Mycobacterium*: *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*. En el hombre, los pulmones son los órganos más afectados; sin embargo, pueden resultar lesionados ganglios linfáticos, meninges, riñones, o extenderse en todo el organismo.

La infección se presenta en dos etapas: una, conocida como tuberculosis primaria, aparece en individuos sin inmunidad específica y puede evolucionar a curación espontánea o conducir a la muerte, y la tuberculosis postprimaria, conocida también como reinfección. Esta última es crónica a pesar de la presencia de inmunidad específica del infectado.(10) (12)

Es una enfermedad que causa gran destrucción de los tejidos. Wolinsky comenta que las dos micobacteriosis destruyen intensamente: la lepra los tejidos externos y la tuberculosis los internos.

*M. tuberculosis* es aerobio y se favorece su desarrollo máximo cuando la  $pO_2$  es de 100 mm de mercurio o mayor, y la  $pCO_2$  de 40 mm de Hg, por lo que los órganos más afectados son los que reciben mayor oxigenación. Los focos más frecuentes son los vértices pulmonares donde la  $pO_2$  es entre 120 y 130 mm de Hg en posición erecta, siguen en frecuencia los riñones y los extremos de crecimiento de los huesos con  $pO_2$  de 100mm de Hg.

Son raros los focos en otros órganos con  $pO_2$  más baja, generalmente el vértice inferior de los lóbulos superiores o la porción superior de los lóbulos inferiores.

Estos eventos duran 2 o 3 semanas ya que el bacilo se multiplica a la velocidad lenta que lo hace en los medios de cultivo artificiales, por lo que los síntomas aparecen tardíos, este es el tiempo en que se desarrolla la inmunidad específica; simultáneamente aparece la alergia y es el período de aparición de la reacción tisular del granuloma tuberculoso. El número de bacilos desciende sensiblemente y la caseificación es importante en la defensa contra la infección.

En los casos en que la infección se detiene, hay curación por combinación de resolución, fibrosis y calcificación.

La infección se vuelve latente en tanto no hay una reactividad meses o años más tarde; sin embargo, hay individuos que mueren sin que aparezca esta reactivación.

La reactivación se presenta a partir de los nódulos calcificados donde queda atrapado el bacilo; y, cuando baja la resistencia del sujeto infectado, el microorganismo se activa y ante su presencia se produce una respuesta de

hipersensibilidad que determina el daño, y la evolución crónica con gran destrucción de tejidos que, sin tratamiento, causa siempre la muerte.

Cuando se ingiere leche cruda proveniente de vacas tuberculosas, la infección primaria se inicia en faringe o intestino.(12) (14) (17)

La entrada y establecimiento de los bacilos determinan una respuesta inflamatoria aguda con neutrófilos, que posteriormente da lugar al foco caseoso de 1 a 2 cm de diámetro llamado de Ghon, la combinación de este con la extensión de la infección a los ganglios de hilio se denomina complejo de Ghon.

La característica de la inflamación granulomatosa consiste en un conglomerado microscópico de células epiteloideas que son histiocitos esféricos semejantes a células epiteliales, y rodean a células gigantes multinucleadas de Lanhans; todo este conjunto está rodeado por linfocitos.

Dentro de las células epiteloideas se observan bacilos, y se considera son causa de que los histiocitos se transformen en las citadas células epiteloideas. Así queda formado el tubérculo microscópico duro, que evoluciona semanas después al tubérculo blando por la necrosis caseosa central que se forma.

En la mayoría de los individuos infectados, el tubérculo experimenta fibrosis progresiva deteniéndose el progreso de la enfermedad, finalmente aparece calcificación de la lesión e incluso osificación. Las imágenes radiológicas de los nódulos calcificados de la lesión inicial se conoce como nódulo de Ghon y a las cicatrices calcificadas de la parte superior del pulmón como nódulos de Simón.

En otros sujetos infectados, la infección progresa como se ha descrito produciendo focos en otros órganos. Las vías de diseminación son la linfa y la sangre; sin embargo, no todos los bacilos que se distribuyen forman focos, ya que muchos son destruidos, y hay tejidos que resisten a la infección. Así es muy raro que aparezcan tuberculosis en corazón, tiroides, páncreas y músculo estriado.

En algunos niños principalmente lactantes y en ocasiones en adolescentes o individuos adultos que no tuvieron contacto previo con el bacilo, la reacción exudativa extensa origina confluencia de muchos granulomas y áreas de consolidación originando la neumonía tuberculosa.(14) (15)

Aparece entonces la tuberculosis miliar, llamada así por la semejanza de las lesiones con las semillas del mijo.

En la neumonía tuberculosa, al expulsar los esputos infectantes pueden producirse focos en la faringe y si se degluten aparece la tuberculosis intestinal.

La lesión pulmonar tuberculosa secundaria suele iniciar en el vértice pulmonar, donde aparece un foco de consolidación de menos de 3 cm de

diámetro situado a 1 o 2 cm de la pleura apical que se acompaña de reacción proliferativa intensa, pero en algunos individuos muy sensibilizados ocurre gran consolidación exudativa. Son áreas bien circunscritas duras, de color gris blanco o amarillo con caseificación central y paredes fibrosas duras. Puede haber encapsulación fibrosa progresiva con cicatrices fibrocalcificadas, hundimiento en la superficie pleural y adherencias en la pleura.

El vaciamiento de la necrosis origina cavernas. Histológicamente hay cambios exudativos y proliferativos: al principio aparecen monocitos y células epiteloideas, proteínas y fibrina; más adelante aparecen granulomas coalescentes de histiocitos, células epiteloideas rodeadas de linfocitos y fibroblastos, células gigantes de Lanhans y caseificación central.(14) (17) (18)

## PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO

Los pasos que se siguieron para la realización de éste proyecto fueron los siguientes:

Se hizo la recepción de las muestras y se trabajaron hasta la identificación de las micobacterias.

Posteriormente se tomaron las cepas de micobacterias que tuvieran un cultivo positivo para *M. tuberculosis* de (+) a (++) y se hizo una suspensión de las micobacterias con solución salina tratando de que se aproximara a una concentración de 3 en escala de McFarland, tratando de no obtener un cultivo muy abundante para poder hacer una cuantificación.

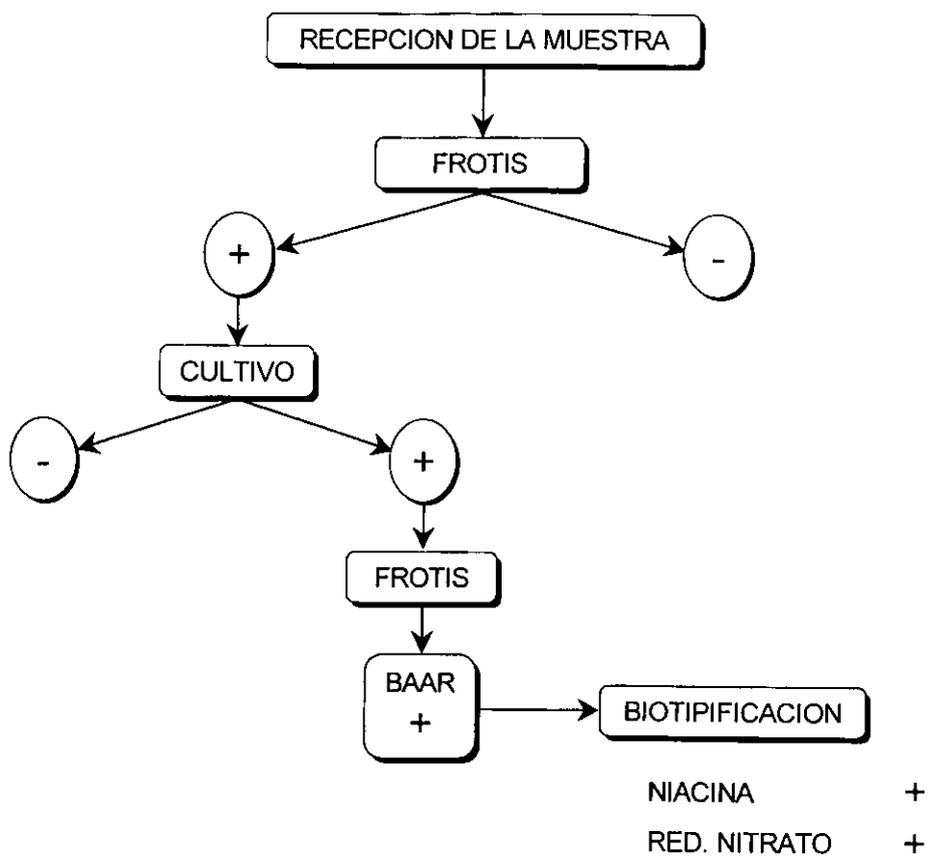
La suspensión se agregó a los medios de criopreservación, se hizo una primera resiembra de dicha suspensión y contaron las colonias de dicha resiembra.

Se procedió a congelar el resto de la suspensión en los diferentes medios durante 3 meses a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Se sacaron las cepas y se hizo una resiembra mas (segunda resiembra) y con las lecturas obtenidas se hizo una comparación de resultados que mas adelante veremos (ver diagrama).

Las técnicas que se siguieron desde la recepción de la muestra hasta la obtención de un cultivo positivo se pueden ver en el anexo.

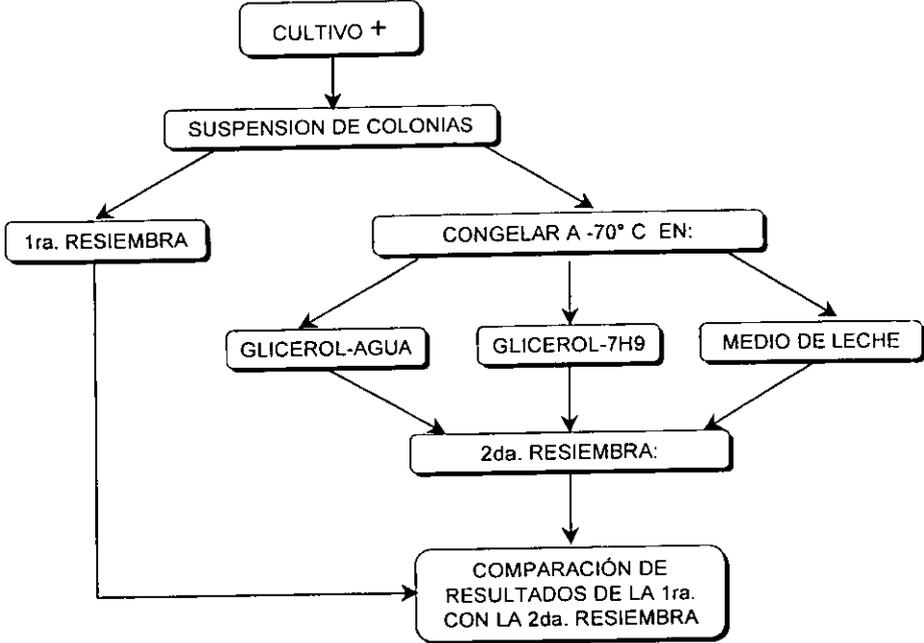
## DIAGRAMA DE FLUJO



Las técnicas de éstos pasos las podemos ver en el anexo.

# CONSERVACIÓN DE CEPAS

II



## SELECCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra utilizada en este proyecto fue expectoración y se eligió en base a la alta incidencia de tuberculosis pulmonar.

Las cepas son de pacientes que acudieron al I.N.E.R. y se les detectó la enfermedad con un cultivo positivo y con su respectiva biotipificación.

Se utilizaron únicamente cepas de *M. tuberculosis*.

## EL CULTIVO

El cultivo es el método bacteriológico de rutina más sensible y específico de los que se conocen para descubrir en una muestra determinada micobacterias y en particular *M. tuberculosis*. Este es un germen exigente que necesita medios enriquecidos especiales, es aerobio, la temperatura óptima para su crecimiento y desarrollo esta entre 35° y 37° C con un pH de 6.7 a 6.9.(10) (12) (13)

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la siembra de la muestra en el medio de cultivo se llevaron a cabo los siguientes pasos:

### OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras fueron obtenidas por expectoración de pacientes sospechosos de tuberculosis, la expectoración fue espontánea o inducida por medio de vaporizaciones o toma de muestra postural, que es sobre la cama bocabajo y con la mitad del cuerpo fuera de ésta.

### HOMOGENEIZACIÓN

La homogeneización de la muestra se hace a fin de liberar el bacilo del moco, material celular y tejidos que puedan acompañarlo.

### DESCONTAMINACIÓN

Eliminación de la flora asociada que se encuentra en la mayoría de las muestras. Los constituyentes de esa flora se multiplican más rápidamente e impiden el desarrollo adecuado del bacilo.

Los homogeneizantes y descontaminantes permiten la licuefacción del moco y de la fibrina así como la destrucción de los gérmenes asociados conservando la viabilidad del bacilo.

Se recomienda el método de Petroff con NaOH al 4%, por su efectividad, bajo costo y por la amplia experiencia que existe a nivel mundial en su empleo.

## DESCONTAMINACIÓN POR EL MÉTODO DE PETROFF

### A) PROCEDIMIENTO:

1. Trabajar frente a la llama del mechero; numerar las muestras colocándolas en línea horizontal sobre la mesa de trabajo.
2. El número de muestras por cada operador no debe ser superior a 12.
3. Colocar en una gradilla igual cantidad de tubos estériles numerados en la misma secuencia que los recipientes que contienen las muestras.
4. Es conveniente emplear tubos con tapa de rosca estériles; si no se cuenta con ellos usar tubos con tapón de hule.
5. Se puede hacer también un tapón de algodón envuelto en gasa que se introduce en el tubo bien ajustado.
6. El extremo de la gasa se dobla sobre la boca del tubo y se asegura con una liga.
7. Colocar en cada tubo 2 mL de la muestra o de la suspensión obtenida por macerado de la misma.
8. Para muestras de esputo o de macerados, es conveniente el uso de pipetas Pasteur grandes (diámetro aproximado de la punta: 3 mm; longitud total aproximadamente de la pipeta: 280 (mm). Si no se dispone de estas pipetas se puede optar por vaciar las muestras directamente en el tubo.
9. Se deben flamear los bordes de los tubos, al abrirlos y antes de cerrarlos.
10. Agregar a cada tubo un volumen igual al de su contenido de NaOH al 4% con rojo de fenol incorporado, ajustar firmemente la tapa del tubo ya que al agitar posteriormente se producen aerosoles que son peligrosos para el operador.
11. Cuando se usa la pipeta Pasteur para tomar la muestra es recomendable que al vaciar al tubo sea primero el NaOH y después la muestra, a fin de facilitar la mezcla del NaOH con las partes de mayor viscosidad, que de lo contrario quedarían adheridas a las paredes interiores de la pipeta.
12. Si se cuenta con equipo mecánico tipo "vortex", agitar los tubos 20 segundos antes de incubar a 37°C durante 15 minutos.
13. La agitación de la muestra también puede hacerse manualmente a intervalos de 5 minutos, a la temperatura indicada.
14. Terminada la incubación centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos. Durante este proceso en el que se producen aerosoles debe cuidarse en forma especial el cierre hermético de los tubos y de la centrifuga.

15. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante en un dispositivo que contenga fenol al 5%.

16. Neutralizar el sedimento con ácido clorhídrico 1N y ácido sulfúrico al 8% antes de sembrar. El proceso de neutralización debe ser muy cuidadoso de manera que el pH no sea menor de 6.5 ni mayor de 7.2. (3) (19) (21)

## B) PROCEDIMIENTO PARA LA SIEMBRA

1. Colocar sobre la mesa de trabajo dos gradillas, una que contenga los tubos de las muestras ya neutralizadas, en la otra se disponen los tubos con medios de cultivos necesarios.

2. Si un tubo con medio contiene agua de condensación ésta debe ser eliminada antes de sembrar.

3. Del producto neutralizado tomar aproximadamente 1 mL con una pipeta Pasteur o de otro tipo y sembrar en cada tubo 0.3 a 0.5 mL, dejando escurrir sobre la superficie el medio sin tocarlo. No es aceptable la siembra indirecta, vaciando de un tubo al otro, porque aumenta el porcentaje de contaminación.

4. La técnica de siembra debe ser meticulosa para seguridad del operador, para no confundir las muestras y para evitar la contaminación de los tubos con gérmenes del ambiente.

5. Las pipetas Pasteur deben flamearse, lo mismo que los tubos después de abiertos y antes de cerrarse. Los tubos con medios de cultivo mientras estén abiertos, deben mantenerse en posición inclinada cerca de la llama del mechero.

6. Una vez sembrados colocarlos sobre una bandeja con fondo inclinado, de manera que el líquido sembrado cubra toda la superficie del medio. Se lleva a la cámara o a la estufa de cultivo con la tapa floja para que pueda evaporarse la parte líquida de la siembra.

7. Después de 48 horas revisar los tubos y si se ha evaporado el líquido, ajustar la tapa de rosca o colocar un tapón de hule quemando e introduciendo previamente el tapón de algodón dentro del tubo. Otra alternativa es emplear en lugar del tapón de hule, uno de plástico fino y ajustar al cuello del tubo con una liga de hule.

8. Posteriormente los tubos pueden ser mantenidos hasta el término del período de observación en posición inclinada. Esto es lo más práctico cuando se dispone de una estufa de cultivo amplia; es recomendable para este objeto usar cajas de fondo inclinado con perforaciones que permitan la circulación uniforme del calor. Si solo se dispone de una pequeña estufa de cultivo puede ser más

útil la posición vertical de los tubos en cesto de malla metálica, pues significa ocupar menos espacio.

9. La incubación de los tubos sembrados debe hacerse a una temperatura que como máximo varíe entre 35° y 37°C con una atmósfera de oxígeno. (3) (19) (21)

## REVISIÓN PERIÓDICA DE LOS CULTIVOS

Los cultivos deben revisarse a los 7, 30 y 60 días, debiendo informarse en cada ocasión únicamente los cultivos que sean positivos. Los cultivos negativos solo se informarán después de 63 días de incubación.

Las colonias típicas de *M. tuberculosis* son de color crema rugosas con aspecto de coliflor; se desarrollan en la superficie del medio y el sitio en el que se implantan no cambia de color. Algunas colonias de *M. tuberculosis* resistentes a isoniacida son más planas y de superficie lisa. Cuando el medio de cultivo está húmedo, las colonias de cualquier especie micobacteriana aparecen lisas.

Las colonias que no tienen morfología típica, deben ser observadas al microscopio en un extendido teñido con Ziehl-Neelsen.

## INFORME DE RESULTADOS DEL CULTIVO.

El informe del cultivo como el de la baciloscopia no debe ser sólo cualitativo sino semicuantitativo, para lo cual se recomienda la siguiente tabla según la CDC:

NEGATIVO (-): No se observan colonias

POSITIVO 1 a 19: El número total de colonias en los tubos sembrados, cuando hay menos de 20.

POSITIVO (+): 20 a 100 colonias

POSITIVO (++) : Colonias separadas (más de 100).

POSITIVO (+++) : Colonias confluentes.

C: Cultivo contaminado. (1) (2) (3) (19) (21)

# CRIOPRESERVACIÓN DE CEPAS

## TÉCNICA

Después de la identificación de las micobacterias, se procedió a hacer una suspensión en solución salina al 0.85 % tratando de obtener una concentración de 3 en escala de McFarland o mayor.

Posteriormente se agregó en una concentración de 1:2 al medio donde se realizaría la criopreservación. De esa nueva suspensión se hizo la primera resiembra con 500 microlitros en el medio de Lowestein-Jensen y lo restante de la suspensión se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 3 meses. Después de este tiempo se sacaron las cepas de la criopreservación y se descongelaron a temperatura ambiente en una cama de agua de hielo tratando de que dicha descongelación fuera lo menos brusca posible para las micobacterias. La suspensión descongelada se homogeneizó para hacer una segunda resiembra en el mismo lote que la primera.

Se procedió a contar las colonias como en el primer caso y se compararon los resultados de las dos resiembras.

Los resultados obtenidos se mencionarán posteriormente. La cuenta se hizo con ayuda de una lupa y se observaron las colonias crecidas hasta ese momento tomando un criterio de separación en las colonias confluentes y si estaban muy juntas se calculaban en base al tamaño de la zona.

## MEDIOS DE CRIOPRESERVACIÓN

Los medios de criopreservación que se utilizaron en este proyecto fueron:

Glicerol-agua al 10 %, Glicerol-7H9 al 10 % y Medio de leche que se hizo en el INER. Utilizado para preservación de gérmenes delicados como los *Pneumococos*.

## PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CONSERVACIÓN:

- **Glicerol - agua al 10%**

glicerol	10 mL.
agua destilada estéril	90 mL.
  
- **Glicerol – Middlebrook al 10%**

glicerol	10 mL.
medio de cultivo Middlebrook	90 mL.
  
- **Medio de leche**

leche en polvo (svelty)	20 gr.
agua Müller-Hinton	2.1 gr
glicerol	20 mL.

Para obtener mejores resultados con este último se hacen alicuotas de 3 o 5 mL. y se guardan en refrigeración a 4°C.(8) (9) (11) (22)

Estos medios se esterilizaron a 15 lb/pg<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos asegurando así un medio estéril para evitar desarrollo de otros microorganismos que puedan interferir con éste estudio.

# R E S U L T A D O S

Media = 95.9  
 DS = 4.00  
 CV = 4.17%

NUMERO	MEDIO DE GLICEROL-AGUA		
	1ra Resiembra = 100%	Resiembra después de congetar	% de la resiembra congelada
1	++	++	100%
2	++	++	100%
3	++	++	100%
4	++	++	100%
5	++	++	100%
6	++	++	100%
7	++	++	100%
8	++	++	100%
9	++	++	100%
10	++	++	100%
11	++	++	100%
12	++	97	97%
13	++	96	96%
14	++	95	95%
15	++	94	94%
16	++	90	90%
17	96	90	94%
18	96	92	96%
19	92	92	100%
20	91	91	100%
21	91	88	97%
22	90	87	97%
23	83	80	96%
24	83	83	100%
25	82	79	96%
26	79	79	100%
27	79	75	95%
28	78	73	94%
29	77	70	90%
30	76	66	87%
31	76	61	80%
32	76	70	92%
33	75	68	91%
34	75	71	95%
35	72	72	100%
36	72	69	96%
37	71	70	99%
38	71	67	96%
39	70	70	100%
40	68	66	97%
41	68	62	91%
42	68	63	93%
43	67	61	91%
44	67	66	99%
45	65	64	99%
46	65	60	92%
47	65	62	95%
48	64	58	91%

Media = 97.8  
 DS = 3.00  
 CV = 3.06%

NUMERO	MEDIO DE GLICEROL-7H9		
	1ra Resiembra = 100%	Resiembra después de congelar	% de la resiembra congelada
1	++	++	100%
2	++	++	100%
3	++	++	100%
4	++	++	100%
5	++	++	100%
6	++	++	100%
7	++	++	100%
8	++	++	100%
9	++	++	100%
10	++	++	100%
11	++	++	100%
12	++	++	100%
13	++	++	100%
14	++	++	100%
15	++	++	100%
16	++	++	100%
17	++	++	100%
18	++	++	100%
19	++	++	100%
20	++	++	100%
21	++	++	100%
22	++	++	100%
23	++	++	100%
24	++	++	100%
25	++	++	100%
26	++	99	99%
27	++	97	97%
28	++	94	94%
29	++	94	94%
30	++	93	93%
31	++	92	92%
32	99	98	99%
33	97	90	93%
34	97	96	99%
35	94	92	98%
36	94	90	96%
37	93	91	98%
38	92	90	98%
39	90	88	98%
40	90	86	96%
41	86	80	93%
42	86	77	89%
43	84	84	100%
44	84	80	95%
45	82	80	97%
46	82	81	99%
47	79	70	87%
48	79	72	91%

Media = 93.5  
 DS = 5.00  
 CV = 5.34%

NUMERO	MEDIO DE LECHE		
	1ra Resiembra = 100%	Resiembra después de congelar	% de la resiembra congelada
1	++	++	100%
2	++	++	100%
3	++	++	100%
4	++	++	100%
5	++	++	100%
6	++	++	100%
7	++	++	100%
8	++	++	100%
9	++	98	98%
10	++	96	96%
11	++	96	96%
12	++	95	95%
13	++	92	92%
14	++	92	92%
15	++	91	91%
16	++	91	91%
17	++	90	90%
18	++	90	90%
19	96	82	85%
20	82	80	97%
21	81	80	99%
22	79	77	97%
23	76	70	92%
24	70	66	94%
25	69	66	96%
26	69	62	90%
27	68	62	91%
28	68	60	88%
29	66	59	89%
30	66	59	89%
31	65	63	97%
32	63	61	97%
33	63	60	95%
34	63	60	95%
35	62	57	92%
36	62	57	92%
37	61	57	93%
38	60	52	87%
39	60	52	87%
40	52	51	98%
41	52	47	90%
42	50	47	94%
43	50	42	84%
44	50	48	96%
45	50	50	100%
46	49	43	88%
47	49	43	88%
48	47	43	91%

## RESULTADOS

Se trabajo con 48 cepas y cabe aclarar que todas las que están marcadas con (++) son cepas que no se pudieron contar precisamente debido a que eran colonias confluentes y se siguió el criterio de resultados de los cultivos según la CDC. Las demás cepas son cultivos de (+) pero para poder obtener resultados cuantificables se puso el numero de colonias que se contaron y así poder hacer cálculos y comparar los diferentes medios de criopreservación.

Los coeficientes de variación de los diferentes medios de criopreservación obtenidos en este proyecto son.

Medio de leche	CV = 5.34 %
Medio de glicerol-agua	CV = 4.17 %
Medio de glicerol-middlebrook	CV = 3.06 %

Si observamos los resultados de los diferentes coeficientes de variación de los medios utilizados en este estudio, utilizando los porcentajes de las colonias que subsistieron y transformando dichos porcentajes en números relativos, lo cual es valido para fines de control de calidad, se observó que los 3 medios utilizados son buenos para hacer una criopreservación a  $-70^{\circ}$  C. lo cual era el objetivo de este proyecto.

También podemos evidenciar que el mejor medio fue el de glicerol-7H9 o Middlebrook, por su CV que es bastante pequeño.

Una muestra más de que se llevó un estricto control de todos los pasos realizados en este trabajo es que las muestras no presentaron contaminación alguna. (ver tablas de resultados)

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este proyecto fueron satisfactorios puesto que no hubo ninguna cepa que se perdiera, por lo tanto podemos recuperar cepas con este método al cabo de 3 meses sin temor a perderlas utilizando cualquiera de estos medios.

Con la bibliografía revisada nos dimos cuenta que no solamente se pueden guardar cepas de micobacterias durante 3 meses, sino que las podemos tener en criopreservación hasta por 5 años.

Después de obtener los resultados se tomaron 20 cepas al azar y se les realizaron las pruebas bioquímicas que nos ayudaron a la identificación de dichas cepas, como son, niacina y reducción de nitratos, obteniendo los mismos resultados que antes. Con lo cual se comprobó que las micobacterias no perdieron sus características fenotípicas.

Comparando los resultados obtenidos, nos podemos dar cuenta fácilmente que el mejor medio para la criopreservación es el medio de glicerol-7H9 y el menos útil para éste fin es el medio de leche.

El medio de leche que fue preparado en el INER y probado para éste proyecto, presentó algunos contratiempos, puesto que en las primeras revisiones periódicas de los cultivos de resiembras, algunos grumos de éste medio se podían confundir con cepas de micobacterias; pero conforme pasó el tiempo dichos grumos se disolvieron con la temperatura de incubación y daban paso a una mejor lectura de los cultivos.

En una opinión muy particular, creo que el mejor medio de criopreservación para cepas de micobacterias es el de glicerol-7H9 por los resultados obtenidos y por la sencillez del método.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, el Laboratorio de Micobacterias del INER está utilizando el medio de glicerol - 7H9 para conservar sus cepas de micobacterias con resultados satisfactorios.

Si comparamos los resultados obtenidos en éste trabajo y los resultados que obtuvo en su trabajo George P. Kubica podemos ver que son muy similares y con esto se comprueba que el trabajo es reproducible y si vemos los resultados del medio de leche que es un medio que no se había probado o del cual no se tiene referencia bibliográfica también podemos ver que es un medio bueno para este fin.

## CONCLUSIONES

En conclusión podemos decir básicamente:

Que todos los medios evaluados son buenos para la criopreservación de micobacterias.

El mejor medio que se utilizó fue el medio de glicerol - 7H9 puesto que tuvo un C.V.= 3.06 en comparación con los demás.

La criopreservación a  $-70^{\circ}\text{C}$  no cambió las características fenotípicas del cultivo.

# ANEXO

En este anexo podemos ver los procedimientos que se llevaron a cabo para llegar a la identificación de las micobacterias y así poder entender mejor la obtención de las colonias, con las cuales se realizó este proyecto.

## IDENTIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS

Se basa en sus propiedades de cultivo, fisiológicas y bioquímicas, otras propiedades útiles para su identificación son la estructura antigénica y la patogenicidad en animales de laboratorio.(3) (5).

Los procedimientos de identificación de micobacterias no son difíciles, pero para llevarlos a cabo hay que familiarizarse con los principios de la serie de 10 pruebas diferenciales y los puntos finales de las reacciones de prueba; las pruebas para la identificación de las micobacterias de importancia clínica, dependen de diferentes grados de reacción, más bien que la presencia o ausencia de la reacción y muchas especies de micobacterias pueden identificarse solamente por diferencias cuantitativas de las reacciones enzimáticas tanto de productos como de actividad.(6) (7)

El resultado de una sola prueba no es útil para la identificación, ya que las especies de micobacterias pueden variar en sus propiedades características. La tipificación de micobacterias se inicia por la selección de colonias BAAR positivo proveniente de medio LJH o 7H10 y 7H11. En estos medios muestra una morfología colonial determinada en LJH *M. tuberculosis* tiene colonias secas rugosas y en forma de coliflor; la morfología colonial de otras micobacterias suelen ser lisa y blanda y puede presentar pigmento.

La velocidad de crecimiento es característica diferencial útil para identificar especies conjuntamente con la producción de pigmento y la fotorreactividad del mismo.(21)

## **LAS ETAPAS QUE SE LLEVARON ACABO FUERON:**

### **IDENTIFICACIÓN Y REGISTRO DE LAS MUESTRAS**

\*Preparar la lista de trabajo con los nombres de los enfermos a quienes corresponden las muestras que se van a procesar, colocando frente a cada uno el número correlativo de laboratorio.

\*Colocar las muestras a procesar sobre la mesa de trabajo en línea horizontal en el mismo orden que tienen en la lista.

\*Numerar en el cuerpo del envase cada una de ellas con el número correlativo correspondiente. Este número debe ser para cada muestra el mismo en la lista de trabajo, en el envase y en el portaobjetos.(19) (21)

## **GUÍA TÉCNICA PARA EL EXAMEN MICROSCÓPICO EN TUBERCULOSIS**

El examen microscópico por baciloscopia es la técnica fundamental en toda investigación bacteriológica en tuberculosis tanto para el diagnóstico como para el control del tratamiento.

El procedimiento se basa en la capacidad de las micobacterias para incorporar y retener ciertos colorantes ante la acción de ácidos y del alcohol, propiedad conocida como ácido-alcohol resistente.(10) (13) (14) (15)

## **PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS DE LA BACILOSCOPIA**

El área de trabajo para baciloscopías requiere de una mesa de por lo menos 1 m por 50 cm, recubierta de un material que pueda desinfectarse fácilmente con soluciones germicidas como el fenol al 5%. Próximo a esta área debe existir un lavamanos dedicado a la coloración de los extendidos.(3)

## IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE BACILOSCOPIA

Los elementos que se requieren para efectuar la técnica son sencillos, de bajo costo y habitualmente están disponibles aún en laboratorios de nivel básico.

### EQUIPO Y MATERIAL

a) Microscopio, binocular o monocular, con objetivo de inmersión que asegure el buen funcionamiento.

b) Envases para muestras, aplicadores de madera, porta objetos, varillas de vidrio para soporte de la tinción, frascos para soluciones colorantes y de decoloración, mechero de gas o alcohol, lápiz grasoso o de diamante, recipiente para eliminación del material contaminado.

### PREPARACIÓN DEL EXTENDIDO

\*Con un lápiz grasoso trazar una línea divisoria obteniendo un tercio destinado a la numeración y dos tercios al extendido.

\*Sobre las partes del extendido con un aplicador se coloca una partícula de la muestra haciendo presión sobre dicha partícula y extendiéndola de modo uniforme mediante movimientos circulares sobre los dos tercios del porta objetos.

Para lograr un grosor homogéneo en el extendido se realizan movimientos de vaivén con el mismo aplicador apoyado horizontalmente hasta lograr una película uniforme.

No se recomienda usar asa metálica porque no se hace un extendido homogéneo y al flamear dicha asa se producen aerosoles que son peligrosos para el operador. Además si se descuida la constancia de su esterilización puede dar lugar a errores.

\*Terminando el extendido se desechan los aplicadores en un recipiente que contenga una solución fenol 5%.

\*Cerrar el envase y colocarlo en otro lugar destinado a muestras procesadas.

Pasar por la flama del mechero los bordes del porta objetos y colocarlos sobre la repisa para que se seque a temperatura ambiente.

\*Al estar secos se fija a cada laminilla con el extendido hacia arriba, pasándola dos o tres veces sobre la llama del mechero.

\*Se colocan los porta objetos ya fijados en otra repisa o en el puente de tinción. (3)

## TINCIÓN DEL EXTENDIDO

La técnica más apropiada es la de Ziehl-Neelsen consta de las siguientes etapas:

### A) COLORACIÓN

1. Se colocan los frotis conservando el orden numérico, sobre el puente de tinción dispuesto en el lavamanos.

2. Se cubre la superficie del extendido con Fucsina fenicada previamente filtrada.

3. Con la llama de un hisopo de algodón humedecido con alcohol calentar suavemente por debajo de las laminillas cubiertas con Fucsina hasta la emisión de vapores blanquecinos visibles.

4. Se elimina la Fucsina tomando el portaobjetos por los bordes del extremo numerado, entre el pulgar y el índice o con una pinza, inclinándolo hacia adelante y lavándolo con agua a baja presión.

5. Se gira la laminilla para lavar la cara inferior, eliminando la Fucsina, que ha escurrido hacia ella.

6. Este procedimiento dura alrededor de 5 minutos.

### B) DECOLORACIÓN

1. Se cubre el extendido con alcohol ácido al 3%.

2. Se toma la laminilla por los bordes del extremo numerado y se efectúa un suave movimiento de vaivén, de modo que el alcohol ácido vaya decolorando la Fucsina, cuando la solución decolorante adquiere una coloración roja se lava con agua y si es necesario, decolorar nuevamente.

3. Se elimina el alcohol ácido, lavando la laminilla con agua a baja presión se considera decolorado el extendido cuando sus partes más gruesas solo conservan un ligero tinte rosado.

4. Esta operación tarda alrededor de dos minutos.

### C) COLORACIÓN DE CONTRASTE

1. Se cubre la superficie del extendido con azul de metileno durante 1 minuto

2. Se elimina el azul de metileno y el porta objetos se lava con agua a baja presión, por la superficie del extendido como por su cara inferior.

3. Las láminas ya teñidas se secan a temperatura ambiente colocándolas verticalmente sobre el papel absorbente y limpio, apoyados sobre una repisa.(3) (13).

### OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

1. Se emplea un microscopio equipado con objetivo de inmersión (100X)

Se coloca una gota de aceite de inmersión sobre el extendido y se procede a enfocar acercando el objetivo, hasta tocar la superficie de la gota de aceite con el objetivo de inmersión, en seguida se ajusta con el tornillo micrométrico.

2. Cada campo microscópico se divide mentalmente en 4 cuadrantes como la esfera de un reloj. La lectura se inicia en el cuadrante superior derecho y, se continúa con los otros en sentido de las manecillas del reloj. Debe observarse en superficie y en profundidad, utilizando constantemente el tornillo micrométrico.

3. La observación microscópica debe establecer en primer termino si se encuentran o no bacilos ácido-alcohol resistentes en el extendido y si los hay el numero promedio aproximado por campo microscópico. Los bacilos aparecen como bastoncillos delgados, ligeramente curvos, teñidos de rojo, generalmente con gránulos más coloreados en su interior, aislados, en parejas o en grupos sobre el azul claro de la tinción de contraste.

4. Se debe seguir una pauta uniforme de observación, leyendo de izquierda a derecha del extendido, después hacia abajo y de derecha a izquierda y así sucesivamente. Se debe leer como mínimo 100 campos.

5. El número de campos observados varía según la cantidad de bacilos.

\*Si no se encuentran bacilos ácido alcohol resistentes o hay menos de un bacilo por campo en promedio, se examinan al menos 100 campos microscópicos útiles.

\*Si se encuentran de 1 a 10 bacilos por campo en promedio, es suficiente la observación de 50 campos.

\*Si se encuentran más de 10 bacilos por campo en promedio, basta con la observación de 20 campos.

6. Terminada la observación se limpia el aceite de inmersión del objetivo con papel suave o gasa, absorbiendo el aceite sin frotar la superficie del lente.

7. El frotis se sumerge en xilol, se escurre para eliminar el aceite y se archiva para un consecuente control de calidad. (3)

## INFORME DE RESULTADOS

Los resultados se informan de la manera siguiente:

**NEGATIVO (-):** No se encuentran bacilos ácido-alcohol resistentes en 100 campos observados.

**POSITIVO (+):** Menos de un bacilo por campo en promedio, en 100 campos observados.

**POSITIVO (++):** De uno a 10 bacilos por campo en promedio en 50 campos observados.

**POSITIVO (+++):** Más de 10 bacilos ácido-alcohol resistentes por campo en 20 campos observados.

\*Si en una lámina se observa entre 1 y 4 bacilos en 100 campos se recomienda la siguiente conducta:

a) Ampliar la lectura a 200 campos.

b) Si no se encuentran más bacilos hacer otro extendido de la misma muestra.

c) Si la lectura de este extendido no modifica el resultado anterior la muestra debe informarse como negativa, consignar el hallazgo de 1 a 4 bacilos en el libro registro de laboratorio solicitar una nueva muestra del paciente. Es conveniente hacer un cultivo en este tipo de muestras.(3) (19) (21)

## REACTIVOS Y COLORANTES

Todos los reactivos y colorantes deben ser de calidad, fucsina básica, azul de metileno, fenol en cristales, ácido clorhídrico, alcohol etílico de 95°, agua destilada y aceite de inmersión.

## CONSERVACIÓN DE REACTIVOS

Se recomienda preparar cantidades suficientes de colorantes para un consumo no mayor de un mes, los cuales se deben mantener en un frasco ámbar.

## TEMPERATURA DE DESARROLLO MÁXIMO DE LAS MICOBACTERIAS

Con base en la temperatura de máximo desarrollo, las micobacterias se clasifican en: termófilas, que desarrollan mejor a 40 C o más, ejemplos de M. avium y M. xenopi; mesófilas, que desarrollan a 37 C, a animales; y psicrófilas, que crecen mejor a 20 C o menos de temperatura por ejemplo M. marinum, M. ulcerans y las micobacterias que afectan a los animales de sangre fría.(12)

## CARACTERÍSTICAS DEL CRECIMIENTO

Las micobacterias obtienen energía de la oxidación de muchos compuestos sencillos de carbono (como glucosa a glicerol). la mayoría de las micobacterias crecen en medios simples con glucosa, sales de amonio, sulfato de magnesio y fosfato de potasio.

Estas bacterias pueden cultivarse a partir de muestras clínicas en medios como LJH, 7H9, 7H10 y 7H11, entre otros, y no requieren de vitaminas u otros factores complejos de crecimiento; la excepción son: M. paratuberculosis que requiere de micobactina y M. leprae el cual no ha sido posible cultivar in vitro.

Estas micobacterias son prototróficas para todos los aminoácidos, bases púricas y pirimídicas, y sólo algunos elementos más son necesarios en su metabolismo (potasio, azufre, fósforo y magnesio).

Sus actividades bioquímicas no son características y su velocidad de crecimiento es más lenta que la mayoría de las bacterias.(3)

### EL MEDIO DE CULTIVO:

El medio de cultivo utilizado en este proyecto se llama Löwestein-Jensen que contiene en gramos por cada 600 mL.:

Potasio dihidrogenofosfato	2.50 gr.
Magnesio sulfato	0.24 gr.
Magnesio citrato	0.60 gr.
L-asparagina	3.60 gr.
Fécula de papa	30.0 gr.
Verde malaquita	0.40 gr.

Si es para *M. tuberculosis* u otras bacterias glicerófilas, añadir 12 mL de glicerina y calentar hasta el punto de ebullición agitando constantemente. Para su uso añadir al substrato enfriado a unos 50 °C un litro de homogeneizada de huevo libre de burbujas, mezclar homogéneamente sin formar burbuja. Envasar en tubos estériles con tapón de rosca o de hule. Dejar coagular, calentando dos veces con un intervalo de 24 horas a 85°C durante 45 minutos en posición inclinada en un gabinete de solidificación de suero o una olla de presión saturada de vapor de agua. Después de este procedimiento se deja el tubo en forma inclinada con medio de cultivo en pico de flauta y esta listo para realizar el cultivo.(13)

## **PRIMER NIVEL DE DIFERENCIACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS**

Cuando hay desarrollo de colonias en un cultivo sugestivo de ser micobacterias, como pasa previo a las pruebas de diferenciación se hace un extendido sobre un portaobjetos al que se ha agregado una gota de agua destilada. Se fija y se tiñe con la técnica de Ziehl Neelsen y se observa al microscopio para comprobar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes. Se anotan además los siguientes datos:

- \*Morfología.
- \*Tamaño.
- \*Otras características.

## **DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO**

### **VELOCIDAD DE DESARROLLO**

En medio de cultivo Lowestein-Jensen, sembrar diluciones bacilares que permitan determinar la velocidad de desarrollo, las características de las colonias (forma, color, etc.) y la temperatura óptima de crecimiento.(12) (13)

### **PRUEBA DE LA NIACINA (KONNO).**

Determina la presencia de ácido nicotínico. Es una prueba básica para hacer la diferenciación de *M. tuberculosis* y de las otras micobacterias.

### **REACTIVOS**

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

## MÉTODO

1. A un cultivo con abundantes colonias de no menos de 4 semanas de desarrollo, agregar 1 mL de agua destilada estéril.
2. Romper el medio con el asa a fin de facilitar la difusión de la Niacina. Dejar el tubo inclinado durante 15 minutos.
3. Colocarse nuevamente el tubo en posición vertical y extraer el líquido con una pipeta provista de propipeta, pasarlo a un tubo limpio y agregar 0.5 mL de la solución de bromuro de cianógeno y 0.5 mL de la solución de anilina.

## CONTROLES

Control positivo: *M. tuberculosis*

Control negativo: sólo reactivos.

## LECTURA E INTERPRETACIÓN

Coloración amarilla significa presencia de Niacina.

NOTA: Al finalizar la prueba debe agregarse a los tubos una solución de NaOH, ya que el bromuro de cianógeno en presencia de ácido, se convierte en ácido cianhídrico, que es muy tóxico.(3)

## PRUEBA DE REDUCCIÓN DE NITRATO (VIRTANEN).

- 1.- Poner de 3 a 4 gotas de agua destilada estéril en un tubo de ensaye.
- 2.- Emulsificar una asada de un cultivo de 3 a 4 semanas ( menor de 30 días)
- 3.- Añadir 2 mL de solución buffer de nitratos e incubar a 37° C por 2 horas.
- 4.- Acidificar con una gota de ácido clorhídrico 1 a 2.
- 5.- Añadir 2 gotas de sulfanilamida.
- 6.- Agregar 2 gotas de n-naftilendiamina.
- 7.- La presencia de una coloración roja en un lapso de 30 a 60 segundos nos indica un resultado positivo para bacterias reductoras de nitratos.

## REACTIVOS

Buffer de nitratos  
Ácido clorhídrico 1 a 2  
Sulfanilamida  
Hidrocloruro de n-naftilendiamina(3).

## INFORMACIÓN DE RESULTADOS DE LA METODOLOGÍA BÁSICA DE TIPIFICACIÓN DE *MICOBACTERIAS*

Los cultivos Niacina positiva serán informados como *M. tuberculosis*.

Los resultados positivos para reducción de nitrato apoyan al diagnóstico de *M. tuberculosis*.

Los cultivos Niacina negativa podrán presentar las características diferenciales a las cuales se les debe hacer otras pruebas para *M. bovis*.

Si hay buen desarrollo a 37 °C se pueden diferenciar dentro de tres grupos de Runyon:

*Micobacterias* fotocromógenas

Grupo I de Runyon

*Micobacterias* escotocromógenas

Grupo II de Runyon

*Micobacterias* no cromógenas

Grupo III de Runyon

En las cepas niacina negativas que se hallan desarrollado mejor en el medio Stonebrink, deben emplearse las pruebas para determinar si se trata de *M. bovis*.

(3)

## BIBLIOGRAFÍA

1. BERKOW Robert y Fletcher Andrew: El Manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica; Salvat; 9a. edición, Barcelona España 1994.
2. BERNARD H. John: Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio Salvat; 9a. edición; Barcelona España 1993.
3. BLANCARTE Melendez Lamberto et. al.: Manual de Técnicas y procedimientos de Laboratorio en tuberculosis; Publicación Técnica del INDRE; México D.F. 1992.
4. FRESAN Magdalena: El sabio apasionado Robert Koch Pangea ; México D.F. 1994.
5. GARCIA García Ma. De Lourdes et. al; tuberculosis epidemiology and control in Veracruz, México, International journal of Epidemiology; 1999. Printed in Great Britain.
6. IOVINNE Enrique y Selva Alejandro: El Laboratorio en la Clínica; 3a. edición; Panamericana; Buenos Aires Argentina 1993.
7. JENSEN Marcus M. y Wright Donald N.: Introducción a la Microbiología Medica; Prentice-Hall Hispanoamericana; México 1985.
8. KUBICA G. P. et. al. Tubercle. Preservation of micobacterias at -70 degrees c. survival of unfrozen suspensions in transit., 1979.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

9. KUBICA G.P. et. al. J. Clin Microbiol. preservation of micobacterias st - 70 degrees c. persistence of key differential features. 1977.
10. KUMATE Jesús et al.: Manual de Infectología; 13a. edición; Méndez Editores; México D:F: 1992.
- 11; LIVANAINEN E. et.al.; Lett. Appl. Microbiol. effect of freezing of water samples on viable counts of enviromental mycobacteria 1995.
12. LUGO De La Fuente Gustavo; Bacteriología médica; Ediciones Cuellar; 1a edición, 1998. pp 165-195.
13. LYNCH Matthew J. et. al.: Métodos de Laboratorio; 2a. edición; Interamericana; México D:F: 1977.
14. MURRAY Patrick R. et. al.: Microbiología Medica; Mosby Year Book; Barcelona España 1992
15. TAY Zavala Jorge et.al.: Microbiología y Parasitología Medicas; Méndez Editores; México D:F: 1993.
16. VALDESPINO J. L. Enfermedades Tropicales en México, Diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica. México D. F. Secretaría de Salud 1994.
17. WESLEY A: Volk et. al.: Microbiología Medica; Interamericana Mc Graw-Hill; México D:F: 1988.
18. YOUMANS Guy P. et. al. Manual de Infectología; Interamericana Mc Graw-Hill 2a. edición; México D.F: 1982.

19. NORMA OFICIAL PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA TUBERCULOSIS EN LA ATENCIÓN PRIMARIA A LA SALUD. Norma No. NOM-006-SSA A2-1993, Diario Oficial de la Federación. Secretaría de Salud.

20. Información Proporcionada por el departamento de Micobacterias de Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE).

21. Manual de Procedimientos para el Laboratorio de tuberculosis; publicación para la SSA México D.F. 1988.

22. Micobacterium tuberculosis resistente en Neumología INFECTOLOGIA Año 17, número 6, junio 1997.