

34

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



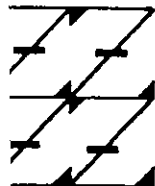
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

OPTIMIZACION DE METODOS PARA LA PRESERVACION
DE MUESTRAS DE EXPECTORACION DE PACIENTES CON
TUBERCULOSIS PULMONAR EN HUACHINANGO, PUEBLA.

298681

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
ARACELI HERNANDEZ CRUZ

**UNAM
FES
ZARAGOZA**



**NO HUMANO EJE
NUESTRA REFLEXIÓN**

DIRECTORA DE TESIS:

M. EN C. MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE

MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE DE 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

JURADO ASIGNADO

Presidente	Q.F.B. Roberto Cruz González Meléndez
Vocal	M. en C Miriam Bobadilla del Valle
Secretario	Q.F.B. Angel García Sánchez
Suplente	Q.F.B. Victor Hugo Becerra López
Suplente	Q.F.B. Rosalba Cervantes Cruz

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de microbiología clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán" y Jurisdicción Sanitaria N° 1, Huauchinango, Puebla, SSA, financiado con fondos del proyecto de CONACYT G26264-M y del proyecto PADEP, UNAM clave # 201313

Si piensas que estás vencido, lo estás;
si piensas que no te atreves, no lo harás;
si piensas que te gustaría ganar
pero que no puedes, no lo lograrás;
si piensas que perderás, ya has perdido;
porque en el mundo encontrarás que
el éxito empieza con la voluntad del hombre.

Piensa en grande y tus hechos crecerán;
piensa en pequeño y quedarás atrás;
piensa que puedes y podrás;
todo está en el estado mental.

CB

Dedico especialmente esta tesis a mis padres,
les doy gracias por su apoyo, cariño y comprensión.
y principalmente por la confianza que han depositado
en mí.

A mis hermanos y hermanas
por su apoyo y confianza

A Eduardo por su amor y comprensión.

A todos mis amigos y
amigas que siempre me
motivaron a seguir
adelante.

Agradezco de manera muy especial a :

M. en C.. Miriam Bobadilla del Valle.

Dr. Midori Kato Maeda.

Dr. Juan Calva Mercado.

Q.F.B. Consuelo Ontiveros Rodríguez

T.L.C. Barbara Chávez Mazari.

Biol.. Anabel Caballero Rivera.

Q.C. Areli Martínez Gamboa.

Q.F.B. Angel García Sánchez

Dr. José Sifuentes Osornio.

Dr. Alfredo Ponce de León

En general a todo el personal del laboratorio de Microbiología Clínica del
INCMNSZ

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de microbiología clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán" y Jurisdicción Sanitaria N° 1, Huauchinango, Puebla, SSA, financiado con fondos del proyecto de CONACYT G26264-M y del proyecto PADEP, UNAM clave # 201313

Indice

	Página
Introducción	1
Antecedentes	3
1. Taxonomía de <i>M. tuberculosis</i>	3
2. Estructura de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	3
3. Diagnóstico de tuberculosis	4
3.1 Manifestaciones clínicas	4
3.2 Baciloscopía	5
3.3 Cultivo de <i>M. tuberculosis</i>	6
3.3.1 Medios de cultivo para el aislamiento de <i>M. tuberculosis</i> ...	9
3.3.2 Condiciones para el crecimiento de <i>M. tuberculosis</i>	10
3.3.3 Identificación del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ...	10
3.3.4 Pruebas de susceptibilidad	11
4. Condiciones de almacenamiento del esputo	12
4.1 Estudios previos sobre conservadores de esputo	13
4.2 Generalidades sobre conservadores o preservadores	14
4.3 Características químicas para un conservador	15
4.4 Propiedades de los agentes utilizados en este estudio	17
5. Justificación	19
6. Objetivo	20
7. Hipótesis	21
8. Material	22
8.1 Equipo de Laboratorio	22
8.2 Reactivos	22
8.3 Medios de Cultivo	23
9. Método	24
9.1 Diseño del estudio	24
9.2 Población del estudio	24
9.3 Criterios de inclusión	24
9.4 Criterios de exclusión	24

9.5 Proceso de muestras de esputo para cultivo de *M. tuberculosis*

9.5.1 Algoritmo del proceso de esputo con los tres agentes
químicos probados

10. Análisis estadístico	27
11. Resultados	28
12. Discusión	38
13. Conclusiones	42
14. Anexo	43
15. Bibliografía	44

Introducción

La tuberculosis es una infección bacteriana producida por microorganismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. bovis* y *M. africanum*). Es transmitida principalmente a través del aire, por gotas de saliva excretadas por individuos con enfermedad pulmonar. Estas son fuentes infectantes cuando expectoran suficientes bacilos como para ser detectados en la baciloscopia, aunque se ha demostrado que pacientes con baciloscopia negativa (paucibacilares), también son capaces de infectar a las personas cercanas a ellos.^{1,2}

La tuberculosis es uno de los problemas de salud más importante a nivel mundial. En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la tuberculosis como un problema emergente. La incidencia de tuberculosis para el año 2000 fue de 10.2 millones de nuevos casos y 3.5 millones de muertes. Se estima que para el año 2005 se incrementa a 11.9 millones de casos al año en el mundo.³ Cerca del 95% de los casos nuevos y de las muertes se presentan en países pobres, con tasas de incidencia que llegan a ser hasta de 500/100,000 habitantes en ciertas localidades.

Entre los factores que han contribuido al resurgimiento de la tuberculosis, se encuentra la epidemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la falta de adherencia a tratamiento, la inmigración, la falta de interés por parte del gobierno en los programas de salud y los problemas socioeconómicos que se presentan en países en vías de desarrollo.⁴⁻⁷ Se estima que en el mundo existen entre 14 y 15 millones de personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y cerca de 6 millones de esas personas también están co-infectadas con *M. tuberculosis*.⁸

En México, entre 1941 y 1976, se observó una disminución en el número de casos de tuberculosis pulmonar; sin embargo se ha observado un incremento a partir de 1985.⁹ En 1986 se realizó la primera Encuesta Nacional de Salud en el país y se observó que debido a las circunstancias en las que vive la población en

las zonas rurales se estimó que habrá para 1996 entre 41,000 y 59,000 casos nuevos de tuberculosis en nuestro país.¹⁰

Una situación que empobrece más el panorama de la tuberculosis es la existencia de tuberculosis resistente a antituberculosos. Aunque no se conoce con precisión, se estima que entre 50 a 100 millones de personas en el mundo están infectadas con *M. tuberculosis* resistente a uno o varios fármacos antituberculosos. Durante los primeros 3 meses de 1991 el Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) reportó que 13 % de los casos nuevos de tuberculosis son resistentes a por lo menos un antibiótico; presentándose brotes causados por estas cepas entre personas infectadas con VIH. La mortalidad asociada a estos casos fue de 72 a 89%.⁶

En 1995 se realizó un estudio de sensibilidad a agentes antimicobacterianos en cepas de *M. tuberculosis* en 84 pacientes mexicanos, donde se observó que la resistencia a isoniacida (INH) y rifampicina fue cuatro veces mayor que la reportada por la OMS para México. En un estudio realizado por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubiran" de 1995 a 1998 en la Jurisdicción Sanitaria No. 1 de Huauchinango, Puebla. se encontró resistencia primaria a INH de 11.9%, estreptomocina 4.2%, rifampicina 4.2%, etambutol 0.8% y multi-resistencia de 2.8%. La resistencia secundaria a INH fue de 29.2%, estreptomocina de 8.3%, rifampicina de 18.7%, etambutol de 2.1% y la multi-resistencia fue de 14.6%.¹¹ Datos semejantes se encontraron en un estudio realizado por la Secretaría de Salud de México en colaboración con el Centro de Control de Enfermedades (CDC) en diferentes estados de la República Mexicana.

Antecedentes

1. Taxonomía de *M. tuberculosis*

La taxonomía de las micobacterias las agrupa de la siguiente forma:

Reino:	Monera
División:	Bacteria
Orden:	Actinomycetales
Familia:	<i>Mycobacteraceae</i>
Género:	<i>Mycobacterium</i>

La familia *Mycobacteraceae* tiene sólo el género *Mycobacterium*. sin embargo, está constituida por 30 especies las cuales se caracterizan por ser bacilos ácido-alcohol resistentes, aerobios, no móviles, no esporulados. El contenido de Guanina + Citosina en su genoma es de 62 a 70% y es similar al encontrado en otras bacterias productoras de ácidos micólicos, como son *Nocardia* (60 a 69%), *Rhodococcus* (59 a 69%), y *Corynebacterium* (51 a 59%). El complejo *Mycobacterium tuberculosis* esta constituido por las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microtti* y *M. africanum*.¹²

2. Estructura de la pared celular de *M. tuberculosis*

El género *Mycobacterium* está formado por bacilos aerobios no esporulados e inmóviles de 0.2-0.6 X 1-10µm. Poseen una pared celular compleja con un esqueleto de peptidoglicano, moléculas de arabinomanana y ácidos micólicos unidos por enlaces covalentes que forman un puente entre la capa rígida y las capas lipofílicas externas de la pared celular lo que le confiere rigidez al esqueleto estructural.

Aproximadamente el 60% del peso seco de la bacteria está constituido por lípidos libres de las capas exteriores de la célula. Estos lípidos contienen ceras (ésteres de ácidos grasos con alcoholes grasos), glucolípidos (compuestos liposolubles formados por lípidos y carbohidratos unidos por enlaces covalentes) y el factor cordón (6,6'dimicolato de trealosa) el cual se ha visto que está asociado a la virulencia de *M. tuberculosis*.¹³ Debido a las características de la pared celular *M. tuberculosis* se le considera un bacilo ácido-alcohol-resistente (BAAR). Esto significa que el bacilo no se puede teñir con las tinciones convencionales. Para poder teñir el bacilo se necesita de la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) que se basa en la aplicación de calor para que la fucsina penetre dentro de la célula y se tiña el bacilo.

3. Diagnóstico de tuberculosis

3.1 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la tuberculosis se describieron hace muchos años; sin embargo, su espectro es tan amplio que el diagnóstico sigue siendo un reto para el clínico.

Se debe sospechar de tuberculosis cuando existen antecedentes de convivencia con personas que padecen tuberculosis pulmonar activa, ya que una tercera parte de los contactos se infecta y de estos, 10% desarrolla enfermedad clínica, la mitad en el primer año y la otra mitad en el transcurso de su vida.¹⁴

La tuberculosis pulmonar se clasifica en infección primaria y en enfermedad por reactivación. La primera forma se presenta en personas que nunca han tenido contacto con *M. tuberculosis*. La mayor parte de los individuos infectados no presenta síntomas y sólo se documenta la infección mediante la conversión del Derivado Proteínico Purificado (PPD). La infección primaria asintomática es controlada generalmente en semanas o meses por medio de una infección granulomatosa, la cual se observa como un nódulo calcificado en la radiografía de tórax. La infección primaria sintomática es más frecuente en niños y adultos jóvenes, y se presenta con fiebre, ataque al estado general, tos y dolor pleurítico,

con o sin derrame pleural, la radiografía de tórax muestra infiltrados pulmonares difíciles de distinguir de una neumonía bacteriana, pero con adenomegalias en la región parahiliar y mediastinal, lo cual sugiere el diagnóstico de tuberculosis.¹⁵

Los BAAR de *M. tuberculosis* que permanecen viables en los granulomas son los causantes de la enfermedad por reactivación. Esta forma representa más del 90% de los casos de tuberculosis pulmonar sintomática.¹⁶ En un enfermo con sistema inmuno-competente las manifestaciones clínicas son: fiebre de predominio vespertino, diaforesis profusa, pérdida de peso y tos que en una tercera parte de los pacientes es hemoptoica. En más del 90% de los casos de tuberculosis pulmonar la radiografía de tórax muestra infiltrados alveolares con tendencia a consolidar áreas con lesiones fibronodulares o cavernas en los segmentos apicales y posteriores del lóbulo superior o en los segmentos superiores del lóbulo inferior.¹⁵

3.2 Baciloscopía

Debido a las características de la pared celular de *M. tuberculosis* se considera acidorresistente. La mejor explicación acidorresistente de las micobacterias se basa en el principio de una barrera lipídica, debido al carácter hidrofóbico de la pared celular de la micobacteria, la penetración de la fucsina dentro de la célula es favorecida por el calor (método de Ziehl-Nielsen) o por la adición de un detergente al colorante (método de Kinyoun).¹²

Se ha estimado que para observar una baciloscopía directa positiva se necesitan aproximadamente de 5×10^3 a 1×10^4 BAAR/mL de esputo. La sensibilidad de esta tinción varía entre 22–80% pero su especificidad es del 95%.^{17, 18}

Para incrementar la sensibilidad de la baciloscopía se ha utilizado la tinción fluorocrómica. Esta tinción se basa en que las bacterias cuando se tiñen con fluorocromos los bacilos son amarillo brillante (auramina) o naranja rojo (rodamina) contra un fondo oscuro, esto permite observar los bacilos brillantes con bajo aumento y se puede leer un mayor número de campos en menos tiempo.¹⁹ La

tinción fluorocrómica tiene alta sensibilidad pero baja especificidad, por ello, se recomienda que cuando la tinción de auramina-rodamina (A-R) es positiva se debe confirmar con tinción de ZN.

Los factores que influyen en la observación de la baciloscopia son: el tipo de muestras examinadas, técnicas de tinción, la velocidad de centrifugación de la muestra y la experiencia del lector.²⁰

3.3 Cultivo de *M. tuberculosis*

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-31-octubre-2000 el cultivo de *M. tuberculosis* se indica cuando se sospecha resistencia a los antimicrobianos de primera línea, si las baciloscopias son negativas, cuando el cuadro clínico sugiere tuberculosis y como apoyo para la investigación epidemiológica.

El aislamiento de *M. tuberculosis* de esputo representa un problema para el laboratorio, ya que el tiempo de replicación de *M. tuberculosis* es de aproximadamente 20 a 22 horas, mientras que la flora normal de la boca como enterobacterias y cocos gram positivos presentes en el esputo pueden tener tiempos de replicación de 30 a 60 minutos.²¹ Esta tasa desproporcionada de crecimiento entre la flora normal y *M. tuberculosis* puede dar como resultado la acumulación de productos de desecho del metabolismo de las bacterias contaminantes, lo que produce un ambiente inadecuado en el esputo para la conservación de *M. tuberculosis*. Por este motivo, el aislamiento efectivo de la micobacteria depende de la eliminación selectiva de las bacterias contaminantes. Cuando se realiza el cultivo de esputo, es necesario descontaminar con un agente químico para reducir el exceso de bacterias contaminantes, digerir las proteínas que forman el moco y concentrar los bacilos por centrifugación.

El alto contenido lipídico en la pared celular de las micobacterias las hace más resistentes a la destrucción por soluciones ácidas o alcalinas, en tanto que las bacterias contaminantes, mueren fácilmente con este tipo de soluciones.

Entre las soluciones descontaminantes más utilizadas en la actualidad se encuentran NaOH, ácido oxálico, sulfato trisódico solo o combinado con cloruro de

benzalconio (Zephiran), cada uno de ellos con ventajas y desventajas para la recuperación de *M. tuberculosis* (Tabla 1). El tiempo de exposición a las soluciones descontaminantes se debe controlar cuidadosamente para evitar la destrucción de *M. tuberculosis* y obtener cultivos falsos negativos.^{12, 13}

En respuesta a la necesidad de mejorar la recuperación de *M. tuberculosis*, Kubica⁴² desarrolló una solución de digestión-descontaminación que contiene NaOH y N-acetil-L-cisteína (NALC). El NALC es un agente mucolítico que puede digerir el moco rompiendo las uniones disulfuro. La ventaja del procedimiento del método NALC es la adición de un volumen grande de amortiguador de fosfatos para neutralizar el pH, eliminar las sustancias tóxicas, y disminuir la densidad de los bacilos para mejorar la sedimentación por centrifugación y mejorar la concentración de los bacilos.

Tabla 1. Agentes utilizados para la digestión-descontaminación de las muestras de esputo.

Agente	Comentario
N-acetil-L-cisteína (NALC) + NaOH al 2%	Solución de descontaminación con NALC para liberar las micobacterias atrapadas en el moco. Tiempo máximo de exposición a NaOH 15 min.
Di-tiotreitol + NaOH al 2%	Agente mucolítico muy efectivo usado con NaOH al 2%. El di-tiotreitol es más costoso que el NALC. Tiempo máximo de exposición 15 min.
Fosfato trisódico al 13% + cloruro de Benzalconio (Zephiran)	No es necesario controlar el tiempo de exposición a esta solución. El Zephiran debe ser neutralizado con lecitina e inoculado en medio de Löwenstein Jensen.
NaOH al 4%	Es la solución de descontaminación más utilizada en los laboratorios. El tiempo de exposición máximo es de 15 minutos.
Fosfato trisódico al 13%	Puede ser utilizada para la descontaminación de muestras cuando el tiempo de exposición se puede controlar en forma precisa. Este reactivo no es tan efectivo cuando se utiliza solo.
Acido oxálico al 5%	Es útil para descontaminar muestras que contienen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Cloruro de cetilpiridinio al 1% + NaCl al 2%	Efectivo como solución de descontaminación para muestras de expectoración enviadas por correo provenientes de pacientes ambulatorios. El bacilo tuberculoso ha sobrevivido 8 días de tránsito sin pérdida significativa.

3.3.1 Medios de cultivo para el aislamiento de *M. tuberculosis*

A fines del siglo XIX las micobacterias no se pudieron recuperar en un medio de cultivo a base de agar. Mediante la experimentación se encontró un medio de cultivo efectivo para aislar *M. tuberculosis* que contenía huevos enteros, fécula de papas, glicerol y sales, y fue coagulado por calentamiento de 85° a 95°C durante 30 a 45 minutos y le llamaron medio de Lowenstein Jensen (LJ). Actualmente se cuenta con diversos medios de cultivo para el aislamiento de *M. tuberculosis* como LJ, Petraghani, agar Middlebrook 7H10 y agar Middlebrook 7H11.²² El medio LJ es el más usado en los laboratorios de diagnóstico clínico, sin embargo, el tiempo de crecimiento de *M. tuberculosis* en este medio es aproximadamente de 4 a 8 semanas. Por estas razones, los fabricantes de medios de cultivo han desarrollado otros medios más eficientes para el crecimiento más rápido de *M. tuberculosis*, que pueden ser manuales, semi automatizados y automatizados.²³

Entre los medios usados con procedimientos manuales, se encuentran el medio Middlebrook 7H9, caldo Dubos, medio Septi-Chek, medio del tubo indicador de crecimiento micobacteriano (MGIT),²⁴ entre los medios semiautomatizados se encuentra el medio radiométrico 12B y entre los automatizados están: MB/BacT Alert (Organon Teknika Durham, NC), el sistema ESP Myco (Difco Laboratories Detroit, Michigan) y MGIT (Becton Dickinson, Cockeysville, MD).²⁵⁻²⁷

En la última década se han realizado estudios en donde se ha observado que para mejorar la recuperación de MTB es necesario inocular la muestra en dos medios de cultivo, uno sólido (7H10, 7H11, LJ) y uno líquido (7H9, MGIT, 12B, MB/BacT Alert). El método estándar en el mundo es el radiométrico en donde se usa el medio 12B y en el cual se ha observado la recuperación de *M. tuberculosis* en un tiempo promedio de 14 días. Estudios han informado que el medio 12B es capaz de detectar en 12 a 13 días un inóculo de 200 bacilos de *M. tuberculosis* viables, y cuando el tiempo de incubación se prolonga, este medio es capaz de detectar cantidades tan pequeñas como 20 bacilos.²⁵

3.3.2 Condiciones para el crecimiento de *M. tuberculosis*

Las condiciones óptimas de crecimiento de *M. tuberculosis* son temperatura 37°C y atmósfera de 5-10% de CO₂. A pesar de que *M. tuberculosis* es un microorganismo aerobio estricto, necesita de atmósfera de CO₂ para poder fijar algunas enzimas importantes de su metabolismo.

3.3.3 Identificación del complejo *M. tuberculosis*

La identificación del complejo *M. tuberculosis* se puede realizar por métodos bioquímicos convencionales, o por métodos moleculares. La selección de las pruebas bioquímicas se basan en la clasificación de Runyon.²⁸ Las pruebas principales que se utilizan para su identificación son: microscópicamente los bacilos se observan en forma de cordones, son de crecimiento lento, las colonias son rugosas, no cromógenas, producen niacina, reducen nitratos a nitritos y no producen catalasa termoestable.^{29, 30}

Con el método radiométrico es posible realizar la identificación de *M. tuberculosis* en forma presuntiva con la prueba de p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona (NAP). El NAP es un precursor del cloranfenicol que inhibe selectivamente el desarrollo del complejo *M. tuberculosis* pero no inhibe el de *Mycobacterium spp.* Con este método es posible obtener la identificación en tres días.²⁵

El método molecular más usado para la identificación del complejo *M. tuberculosis* son las sondas de ácidos nucleicos (ACU-Probe; Gene Probe, San Diego, CA).³¹ Este método se basa en la hibridación del DNA obtenido de la cepa con una sonda específica del RNA ribosomal 16S diseñada de una cepa de referencia (H37Rv) marcada con éster de acridina, si hay hibridación genera luz, la cual es medida en un luminómetro. Otro método molecular es la amplificación por la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) de la secuencia de inserción IS6110 presente sólo en *M. tuberculosis*.^{32, 33}

Existen otros métodos más sofisticados para la identificación de *M. tuberculosis* los cuales se basan en la identificación del perfil de ácidos micólicos presentes en la pared celular de la micobacteria. Entre estos métodos se encuentran la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y la cromatografía gas-líquido.¹² Estas nuevas alternativas son igual o mejores que los métodos de identificación convencional y más rápidos, sin embargo sus inconvenientes son el costo alto y la necesidad de personal especializado.

3.3.4 Pruebas de susceptibilidad

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se deben realizar en todos aquellos aislados clínicos de *M. tuberculosis* en donde el paciente tuvo falla a tratamiento, recaída, tiene VIH y ante la sospecha de resistencia secundaria por falta de adherencia al tratamiento, antecedentes geográficos o por el contacto laboral. Sin embargo, para realizar estas pruebas es necesario contar con el aislado clínico. Por ello, es necesario contar con laboratorios especializados.

Las pruebas de susceptibilidad se deben hacer inicialmente a los antibióticos de primera línea: estreptomina, isoniacida, rifampicina y etambutol. Sólo si la cepa es resistente a estos antibióticos se deberán hacer pruebas de susceptibilidad a antibióticos de segunda línea en laboratorios con experiencia para obtener resultados fidedignos.^{34, 35}

4. Condiciones de almacenamiento del esputo.

La colección y transporte de muestras para cultivo y examen microscópico son procedimientos vitales para el diagnóstico de tuberculosis. Actualmente, existen cinco tipos de muestras respiratorias para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar: muestras de esputo de primera hora de la mañana, esputo inducido, aspiración gástrica, lavados bronquiales y aspiración transtraqueal.

En la década de los 70's se recomendaba que el paciente colectara las muestras de esputo de 24 horas para obtener mayor cantidad de micobacterias y mejorar la sensibilidad de la baciloscopia. Sin embargo esto aumentaba la contaminación bacteriana y de hongos de manera muy significativa.³⁶ En la actualidad se usan procedimientos de concentración que son más eficaces y requieren tres muestras matinales para alcanzar el mismo grado de recuperación.

La aspiración gástrica se realiza en enfermos que no pueden expectorar. El material aspirado se obtiene a primera hora de la mañana y se neutraliza inmediatamente con bicarbonato de sodio, ya que las micobacterias no sobreviven durante largos periodos de tiempo a pH tan ácido como el jugo gástrico. Los lavados bronquiales y el aspirado transtraqueal son realizados en pacientes hospitalizados.

Habitualmente puede establecerse un diagnóstico provisional de tuberculosis por la demostración de BAAR en esputo (baciloscopia). La OMS recomienda realizar en cada paciente la baciloscopia en tres muestras de esputo para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar.²³

Una muestra del material apropiado y transportado de manera correcta puede ofrecer la confirmación bacteriológica de la evidencia radiológica o clínica de la tuberculosis. La mejor muestra para hacer el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar es el esputo. El esputo debe colectarse con las siguientes condiciones: en recipientes limpios y desechables, deben sellarse y empacarse cuidadosamente para evitar derrames o roturas. De preferencia se deben obtener las tres muestras en días sucesivos. La muestra se debe enviar al laboratorio lo más pronto posible, o de lo contrario refrigerarse.³⁶⁻³⁸

Debido a que el aislamiento de *M. tuberculosis* depende básicamente de la obtención correcta de las muestras y de la eliminación de bacterias contaminantes, se deben dar las siguientes indicaciones al paciente: se debe enjuagar la boca antes de recoger el esputo para dejarla libre de alimentos o drogas orales, se debe recoger sólo el material exudativo obtenido de los pulmones después de una tos profunda, no deberá dar descarga nasofaríngea ni saliva.

La posibilidad de aislar *M. tuberculosis* aumenta si la muestra se procesa el mismo día en que fue colectada. En nuestro país es frecuente que los pacientes vivan en lugares distantes al laboratorio por lo que las muestras no son procesadas de inmediato. En la actualidad no existen medios de transporte para coleccionar y transportar esputo debido a que el medio ideal debe impedir la sobrepoblación de bacterias de la flora normal y permitir el aislamiento de *M. tuberculosis*, aún cuando la muestra se procese días después de haber sido colectada sin refrigeración.³⁸

Existen estudios en donde se almacenaron varias muestras de esputo en un sólo contenedor con el fin de observar si se mejoraba la recuperación de *M. tuberculosis* o la observación microscópica. Se demostró que las muestras de esputo que contienen *M. tuberculosis* crecen más rápido y con menos contaminantes cuando el paciente expectora durante las primeras horas de la mañana.³⁶

4.1 Estudios previos sobre conservadores de esputo

Debido a que en ocasiones no es posible procesar la muestra de manera inmediata, es importante contar con conservadores de esputo que nos permitan aislar *M. tuberculosis* en muestras que se han recolectado tiempo atrás.

En un estudio realizado en 1967 donde se comparó la colección de esputo durante 72 horas y el esputo colectado durante la mañana para observar si se mejoraba el aislamiento de *M. tuberculosis*, los investigadores utilizaron el carbonato de sodio para retardar el crecimiento de contaminantes.³⁶

Otro estudio realizado en los 70's probó el cloruro y el bromuro de cetilpiridinio con cloruro de sodio como medio para transportar esputo y realizar el cultivo de *M. tuberculosis*. En este estudio se observó que dichos compuestos químicos no alteraban las propiedades de tinción de los BAAR, ni su viabilidad, durante un lapso de por lo menos 14 días a temperatura ambiente pero la recuperación del bacilo fue pobre.^{39, 40}

En 1983, se describió el efecto comparativo entre la Cloramina T y el borato de sodio para la preservación de *M. bovis* en muestras de tejidos, y observaron que la solución saturada de borato de sodio fue mejor conservador que la Cloramina T para la recuperación del bacilo.⁴¹ Otros estudios mostraron que si las muestras eran transportadas en hielo o a temperatura ambiente por no más de tres días era posible la recuperación de *M. tuberculosis*.^{37, 38}

4.2 Generalidades sobre conservadores o preservadores

En la actualidad no existen conservadores de *M. tuberculosis*. Existen sustancias químicas capaces de inhibir o matar ciertos microorganismos y permitir el crecimiento de otros. Estas son sustancias desde elementos metálicos pesados, como la plata y el cobre, hasta moléculas orgánicas complejas como los compuestos de amonio cuaternario. Las diversas sustancias ejercen su efecto antimicrobiano por diferentes vías y sobre diferentes grupos de microorganismos. También varían los efectos que tienen sobre las superficies o los materiales sobre los que se aplican, en algunos no producen ningún efecto, mientras que otros son destruidos.

Los conservadores o mejor conocidos como preservadores se han usado en las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos. El preservador es un agente químico o físico que previene la deterioración biológica del material que se quiere preservar.⁴³ Los compuestos de amonio cuaternario se encuentran entre los más usados. Estos han sido valorados en cuanto a su utilización como desinfectantes, antisépticos y sanitizantes. El poder bactericida de estos compuestos es frente a bacterias gram positivas, gram negativas y hongos, pero

no matan ni inhiben las esporas bacterianas y fúngicas ni son eficaces contra el bacilo de la tuberculosis.

Se han propuesto varios mecanismos de acción antimicrobiana de los compuestos cuaternarios, incluidas la inhibición enzimática, la desnaturalización de proteínas y la destrucción de la membrana celular causando una pérdida de los constituyentes vitales. Ejemplos de estos compuestos son: el cloruro de banzalconio (Zephiran), el cloruro de benzetonio (Phemerol) y el cloruro de cetilpiridinio (Ceepryn) los cuales se han usado en la industria alimentaria,

Ningún agente químico antimicrobiano tiene todas las características para ser utilizado en forma general en la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos. Esto no es sorprendente debido a la variedad de condiciones de temperatura, pH y concentración en que los agentes son utilizados, las diferencias en su mecanismo de acción y los tipos de células microbianas que hay que destruir. De los agentes químicos usados como conservadores se encuentran las soluciones alcalinas, las cuales tienen la función básica de desnaturalizar proteínas y la emulsificación y saponificación de lípidos. El carbonato de sodio es usado comúnmente como álcali y sirve como agente amortiguador, el borato de sodio puede ser usado como preservador de margarina, embutidos, carne, pescado y frutas cítricas.⁴³

4.3 Características químicas para un conservador de esputo para el crecimiento de *M. tuberculosis*

De acuerdo a la experiencia en otras industrias y de las necesidades para aislar *M. tuberculosis*, se consideran los siguientes puntos para la elección de un agente químico que destruya la flora normal de la boca y permita el crecimiento de los microorganismos de interés.

a) Actividad antimicrobiana

El primer requisito del conservador es la capacidad de la sustancia para matar a los microorganismos de la flora normal de la boca. El agente químico debe ser efectivo en la destrucción microbiana, a pesar de los cambios de temperatura, de pH, el tiempo de exposición, la concentración del preservador y la presencia de materia orgánica extraña.

b) Solubilidad

La sustancia debe ser soluble en agua u otros solventes en la cantidad suficiente que permita su uso efectivo.

c) Estabilidad

Los cambios que sufra la sustancia deben ser mínimos a lo largo del tiempo mientras permanece en un estante y estos cambios no deben dar como resultado una pérdida significativa de la acción antimicrobiana.

d) Disponibilidad y costo.

Se debe disponer del compuesto en grandes cantidades y a un precio razonable.

4.4 Propiedades de los agentes utilizados en este estudio.

Las propiedades químicas de los agentes utilizados en este estudio son:

a) Carbonato de sodio

Es un agente químico alcalino, inodoro, higroscópico, soluble en agua y glicerol a temperatura ambiente e insoluble en alcohol. En solución es fuertemente alcalino (pH =11.6). Se debe conservar en frasco bien cerrado. Se usa como agente alcalinizante en la industria farmacéutica.⁴⁴

b) Borato de sodio

Cristales inodoros, soluble en glicerol e insoluble en alcohol, su solubilidad en agua es de 1g en 16 mL. En solución es un compuesto alcalino (pH = 9.5). Se usa como preservador, como antiséptico contra hongos en madera y como agente alcalinizante en la industria farmacéutica.⁴⁴

c) Cloruro de cetilpiridinio

Polvo blanco monohidratado, soluble en agua, alcohol y cloroformo. Se usa como conservador en la industria farmacéutica, es antiséptico tópico y desinfectante.⁴⁴

Actualmente no existen estudios en los cuales se haya probado el carbonato de sodio, el cloruro de cetilpiridinio y el borato de sodio como conservadores de esputo que nos permitan aislar *M. tuberculosis* en cultivo. En este trabajo se compararon estos tres agentes químicos como conservadores de esputo y se optimizaron para permitir el almacenamiento de la muestra respiratoria. Se evaluó la capacidad de los conservadores de permitir el

crecimiento de *M tuberculosis*, el tiempo máximo de utilidad del conservador para el crecimiento de *M. tuberculosis* y el grado de contaminación bacteriana. Para contestar estas preguntas se colectó esputo de pacientes con baciloscopia positiva de la Jurisdicción # 1 de Huauchinango, Puebla. Esta jurisdicción abarca 360 Km² y cuenta con 390,596 habitantes. Debido a la extensión territorial tan grande y la dificultad en los caminos, las muestras de los pacientes pueden llegar al laboratorio hasta después de siete días sin el almacenamiento apropiado.

5. Justificación

El aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras clínicas se ve afectado por la presencia de la flora bacteriana contaminante de la boca, la cual se incrementa por el tiempo y la temperatura de almacenamiento. En la actualidad no se cuenta con ningún conservador de esputo que permita el transporte y almacenamiento de la muestra hasta su proceso.

Un conservador de esputo permitirá que las muestras de pacientes que se encuentran en lugares distantes al laboratorio clínico, lleguen en buenas condiciones y podamos aislar *M. tuberculosis*.

6. Objetivo

Comparar el carbonato de sodio, el cloruro de cetilpiridinio y el borato de sodio como conservadores de esputo para disminuir la contaminación e incrementar la posibilidad de cultivar *M. tuberculosis*.

7. Hipótesis

Alguno de los tres agentes químicos (carbonato de sodio, cloruro de cetilpiridinio y borato de sodio) a probar será el apropiado para la conservación de *M. tuberculosis* en muestras de esputo de pacientes con tuberculosis pulmonar.

8. Material

8.1 Equipo de Laboratorio

- ❖ Campana de seguridad biológica tipo III, Forma Scientific, Marietta Ohio, EUA.
- ❖ Incubadora de CO₂ Forma Scientific Marietta Ohio, EUA.
- ❖ Centrifuga GS-6 Beckman, EUA.
- ❖ Refrigerador Nieto, México, D.F.
- ❖ Balanza analítica Scientech, Inc. Arapahoe Avenue Boulder, EUA.
- ❖ Vortex Lab-Line Instruments, Inc. Illinois, EUA
- ❖ Equipo MGIT 960 (Becton Dickinson, Maryland Bethesda, EUA).
- ❖ Microscopio de luz (Carl Zeiss de Mexico, S.A. de C.V.)
- ❖ Microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss de Mexico, S.A. de C.V.)

8.2 Reactivos

- ❖ Hidróxido de sodio en lentejas, J.T. Baker de México.
- ❖ Citrato de sodio, J.T. Baker de México.
- ❖ Fosfato dibásico de sodio, J.T. Baker de México.
- ❖ Fosfato monobásico de potasio, J.T. Baker de México.
- ❖ Cristales de Fenol J.T. Baker de México.
- ❖ N-acetil-L-cisteína, Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA.
- ❖ Auramina O Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA.
- ❖ Rodamina B Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA.
- ❖ Permanganato de potasio J.T. Baker de México
- ❖ Fucsina básica Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA
- ❖ Azul de metileno Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA
- ❖ Ácido clorhídrico J.T. Baker de México

- ❖ Carbonato de sodio J.T. Baker de México
- ❖ Cloruro de cetilpiridinio Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA
- ❖ Borato de sodio J.T. Baker de México
- ❖ Alcohol 96°
- ❖ Aceite de inmersión

8.3 Medios de Cultivo.

- ❖ Löwenstein Jensen (LJ) Difco, Detroit, EUA.
- ❖ Gelosa sangre de carnero al 5% (GSC), BIOXON.
- ❖ Tubo indicador de crecimiento micobacteriano (MGIT).
- ❖ Viales con polimixina B, anfotericina B, ácido nalidixico, trimetropim y azlocilina (PANTA) Becton Dickinson México D.F.
- ❖ Viales con ácido oleico, albumina, dextrosa, catalasa (OADC) Becton Dickinson México D.F.

9. Método

9.1 Diseño del estudio

Estudio prospectivo, observacional, transversal y comparativo.

9.2 Población del estudio

Se estudiaron 58 muestras de esputo con baciloscopía positiva de abril de 1999 a abril del 2000 en pacientes con tuberculosis pulmonar en los municipios de la Jurisdicción N° 1 de Huauchinango, Puebla.

9.3 Criterios de inclusión

- a) Pacientes de ambos sexos, de cualquier edad que acepten entrar al estudio (ver carta de consentimiento informado). Ver anexo
- b) Diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar, que tengan baciloscopía positiva confirmada.
- c) Pacientes con falla o abandono al tratamiento, que tengan baciloscopía positiva después de tres meses de haber iniciado el tratamiento.

9.4 Criterios de exclusión

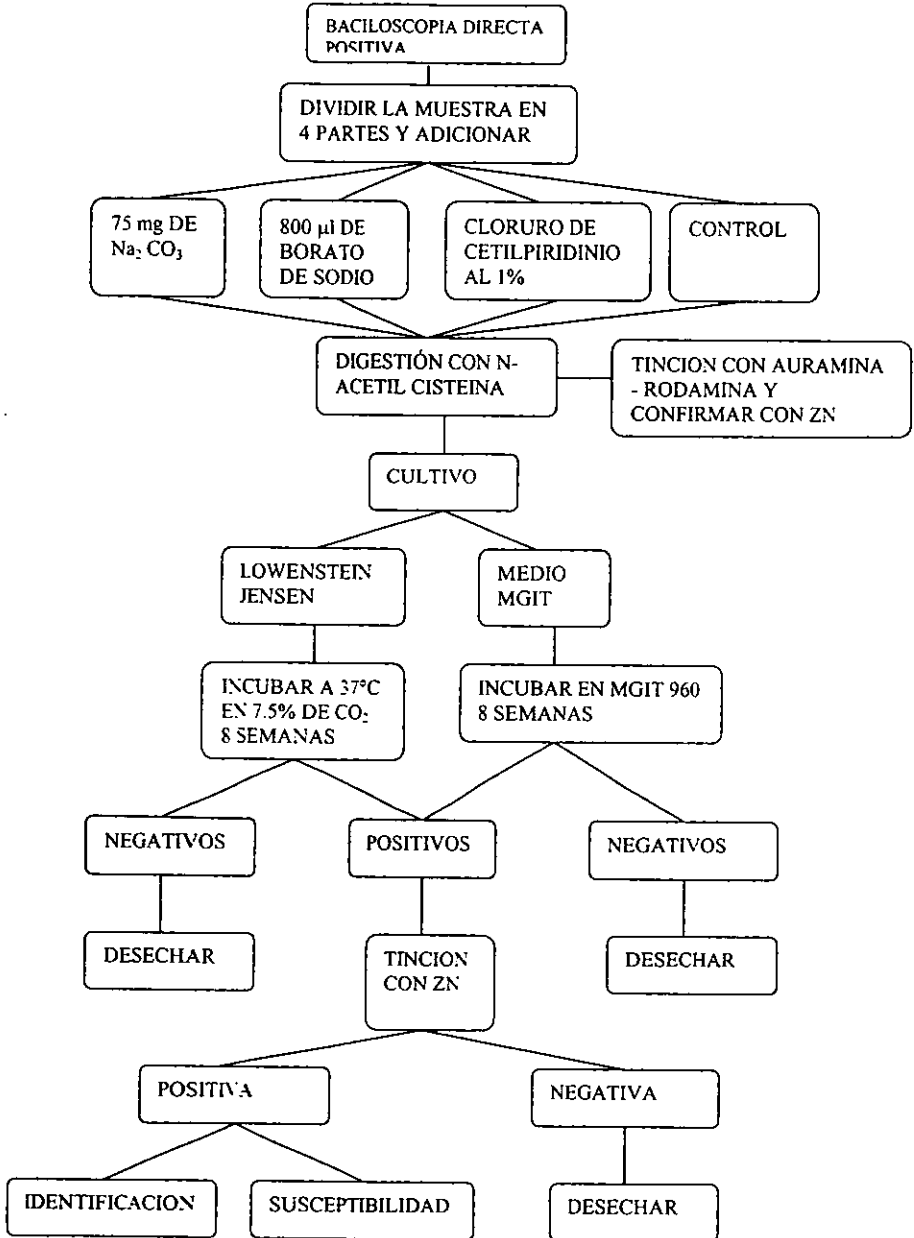
- a) Pacientes que no acepten entrar al estudio.
- b) Pacientes con baciloscopía negativa.

9.5 Proceso de muestras de esputo para cultivo de

M. tuberculosis

1. A los pacientes con diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar se les realizó baciloscopia directa.
2. Cuando la baciloscopia fue positiva, la muestra de esputo se dividió en cuatro porciones y cada una de ellas se colocó en un tubo cónico con capacidad de 50 mL con los siguientes reactivos: el primero con 75 mg de carbonato de sodio, el segundo con 800 µl de una solución saturada de borato de sodio, el tercero con un volumen igual de cloruro de cetilpiridinio al 1% y el cuarto sin reactivo (control), las muestras se dejaron a temperatura ambiente (25-35° C).
3. Las muestras se transportaron al Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición "Salvador Zubiran" en un lapso de 5-18 días.
4. En cuanto llegaron las muestras al laboratorio se descontaminaron por el método de N-acetil-L- cisteína.⁴²
5. Del sedimento de la muestra descontaminada se realizó frotis y se tiñó con Auramina-Rodamina, y se confirmó con ZN.
6. El sedimento se resuspendió en aproximadamente 2 mL de amortiguador de fosfatos y se inocularon 0.5 mL en LJ y 0.5 mL en MGIT.
7. El LJ se incubó a 37°C con 7.5% de CO₂, los cultivos se revisaron cada semana hasta completar ocho semanas.
8. El MGIT se incubó en el equipo MGIT 960 (Becton Dickinson, Maryland Bethesda, USA). El equipo tiene un lector automatizado que indica cuando hay un cultivo positivo. Los cultivos negativos se descartaron hasta las ocho semanas de incubación.
9. A los cultivos positivos tanto de LJ como de MGIT se les hizo un frotis que se tiñó con ZN, cuando fue positivo, se identificaron por métodos convencionales¹³ o con sonda de ADN (Gene Probe) y se les realizó pruebas de susceptibilidad antimicrobiana con el método radiométrico.

Algoritmo del proceso de esputo con los tres agentes químicos probados



10. Análisis estadístico

Para conocer si hubo diferencia estadísticamente significativa en la proporción de cultivos positivos, cultivos contaminados y las muestras negativas se usó la prueba de χ^2 . Para conocer si hubo diferencia estadísticamente significativa en los tiempos de exposición a los conservadores se usó la prueba *t* de student

11. Resultados

11.1 Recuperación de *M. tuberculosis* en medio LJ y medio MGIT

Se procesaron 58 muestras de esputo con baciloscopia positiva. Cada muestra se dividió en cuatro partes, cada parte se dejó en presencia de uno de los tres agentes químicos (carbonato de sodio, cloruro de cetilpiridinio y borato de sodio), y una parte sin conservador como control durante un lapso de 5 a 18 días a temperatura ambiente. La tabla 1 muestra el porcentaje de recuperación de *M. tuberculosis* (MTB) en LJ, donde se observa que en presencia del cloruro de cetilpiridinio se recuperó el 98.3%, solamente hubo un cultivo falso negativo, y ninguno presentó contaminación. Para el conservador carbonato de sodio la recuperación de *M. tuberculosis* fue de 86.2%, solamente se presentó un cultivo falso negativo, y la contaminación fue de 12.1%. Para el conservador borato de sodio la recuperación fue de 63.8%, dos cultivos falsos negativos y contaminación de 32.8%. En la muestra control la recuperación fue solamente del 48.3%, no hubo cultivos falsos negativos y la contaminación fue del 51.8%.

La tabla 2 muestra el porcentaje de recuperación de *M. tuberculosis* con cada uno de los conservadores en medio MGIT. Con el conservador cloruro de cetilpiridinio la recuperación de *M. tuberculosis* fue de 70.7%, hubo nueve cultivos falsos negativos y hubo contaminación del 13.7%; para el carbonato de sodio hubo recuperación de *M. tuberculosis* del 98.3%, un cultivo falso negativo y no hubo contaminación. En presencia del conservador borato de sodio se recuperó el 86.2% de *M. tuberculosis*, no hubo cultivos falsos negativos y hubo 13.8% de contaminación. En la muestra control se recuperó el 77.6% de los cultivos positivos, no hubo cultivos falsos negativos y la contaminación fue del 22.4%.

Tabla1. Resultados de la recuperación de *M. tuberculosis* en Löwenstein Jensen con cada uno de los agentes químicos utilizados

AGENTE QUÍMICO	MTB n(%)	NEGATIVO n(%)	CONTAMINACION n(%)
Carbonato de sodio* n = 58	50 (86.20)	1 (1.70)	7 (12.1)
Cloruro de Cetilpiridinio* n = 58	57 (98.30)	1 (1.70)	0 (0.00)
Borato de sodio n = 58	37 (63.80)	2 (3.40)	19 (32.8)
Control n = 58	28 (48.30)	0 (0.00)	30 (51.8)

* El número de cultivos positivos fue mayor al esperado con significancia estadística ($p < 0.05$). Prueba χ^2

La mayor recuperación de *M. tuberculosis* fue en presencia de cloruro de cetilpiridinio seguido de carbonato de sodio. Destaca la pobre recuperación de *M. tuberculosis* en ausencia de conservador, principalmente por la contaminación por otros microorganismos.

Tabla 2. Resultados de la recuperación de *M. tuberculosis* en MGIT con cada uno de los agentes químicos utilizados

AGENTE QUÍMICO	MTB (n) %	NEGATIVO (n) %	CONTAMINACION (n) %
Carbonato de sodio* n = 58	57 (98.30)	1 (1.70)	0 (0.00)
Cloruro de Cetilpiridinio n = 58	41 (70.70)	9 (15.50)	8 (13.7)
Borato de sodio n = 58	50 (86.20)	0 (0.00)	8 (13.8)
Control n = 58	45 (77.60)	0 (0.00)	13 (22.4)

* El número de cultivos positivos fue mayor al esperado con significancia estadística ($p < 0.05$). Prueba χ^2

La mayor recuperación de *M. tuberculosis* fue con el carbonato de sodio. La recuperación con el cloruro de cetilpiridinio fue muy baja en comparación con la recuperación en LJ. Esto se debe principalmente a que en el medio MGIT no existe lecitinasa (presente en LJ) que inactiva la acción bactericida del cloruro de cetilpiridinio

11.2 Recuperación de *M. tuberculosis* en medio LJ y medio MGIT de acuerdo con el tiempo de exposición del esputo con cada uno de los agentes químicos probados.

En las Tablas 3 y 4 se muestra la recuperación de *M. tuberculosis* en LJ y en MGIT respectivamente con respecto al tiempo de exposición del esputo con cada uno de los agentes químicos utilizados. El tiempo máximo de contacto del esputo con el agente químico fueron ocho días tanto con el carbonato de sodio como con el borato de sodio donde se observó mayor recuperación de *M. tuberculosis* comparado con el control. Después de los ocho días de exposición disminuyó el número de cultivos positivos y se incrementó la contaminación. Con el cloruro de cetilpiridinio se recuperó *M. tuberculosis* en un intervalo de 5-18 días, aunque de los dos cultivos expuestos a este agente durante 18 días sólo uno se recuperó.

En la tabla 5 se muestra que en medio LJ la mejor recuperación de *M. tuberculosis* fue con cloruro de cetilpiridinio en donde 57/58 muestras fueron positivas a dicho agente, el tiempo promedio de exposición fue de 7.61 días. El tiempo promedio de exposición al carbonato de sodio fue de 7.58 días para el cultivo positivo y para el cultivo negativo fue de 11.25 días. Solo hubo diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de exposición en presencia de carbonato de sodio contra el borato de sodio y el control.

En la tabla 6 se observan los resultados de la comparación del tiempo de exposición del esputo con cada uno de los agentes químicos probados y los cultivos positivos y negativos de *M. tuberculosis* en medio MGIT. La mayor recuperación fue en las muestras con carbonato de sodio en donde se aisló *M. tuberculosis* en 57/58 muestras.

El tiempo promedio de exposición entre los cultivos positivos y negativos fue estadísticamente significativo con todos los agentes químicos excepto con carbonato de sodio donde no fue posible calcularse.

11.3 Resultados de las tinciones con auramina-rodamina y ZN del esputo expuesto a los agentes químicos probados.

En las tablas 7 y 8 se observan los resultados de la tinción con auramina - rodamina y la tinción de ZN del esputo expuesto con cada uno de los agentes químicos probados. Con respecto a la exposición del esputo con carbonato de sodio se observó el 91.4% de las muestras positivas tanto con auramina-rodamina como con ZN; con el cloruro de cetilpiridinio sólo se observó el 31% de muestras positivas con auramina-rodamina y 37.9% con ZN. Con el borato de sodio y el control se observaron positivas en el 96.6% y 98.3% respectivamente con ambas tinciones.

Tabla 3. Resultados del crecimiento de *M. tuberculosis* en LJ con respecto a los días de exposición del esputo con cada uno de los agentes químicos probados

N° de días expuestos	n= 58	Carbonato de sodio n (%)	Cloruro de cetilpiridinio n (%)	Borato de sodio n (%)	Control n (%)
5	8	6 (75)	8 (100)	2 (25)	2 (25)
6	17	16 (94.1)	17 (100)	12 (70.5)	8 (47)
7	13	11 (84.6)	13 (100)	10 (76.9)	6 (46.1)
8	6	6 (100)	6 (100)	4 (66.6)	1 (16.6)
9	8	7 (87.5)	8 (100)	6 (75)	7 (87.5)
15	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
16	3	2 (66.6)	3 (100)	1 (33.3)	2 (66)
18	2	1 (50)	1 (50)	1 (50)	1 (50)

El tiempo de exposición del esputo a los diferentes conservadores varió de cinco a 18 días. La mayor parte de las muestras estuvieron en el conservador por 7 días o menos. La mayor recuperación con carbonato de sodio y cloruro de cetilpiridinio se observó cuando estuvieron almacenados por seis días o menos. Conforme aumentaron los días de exposición del esputo con el agente químico disminuyó la recuperación de *M. tuberculosis*

Tabla 4. Resultados del crecimiento de *M. tuberculosis* en MGIT con respecto a los días de exposición del esputo con cada uno de los agentes químicos probados

Días expuestos	n= 58	Carbonato de sodio n (%)	Cloruro de cetilpiridinio n (%)	Borato de sodio n (%)	Control N (%)
5	8	8 (100)	7 (87.5)	5 (62.5)	5 (62.5)
6	17	17 (100)	14 (82.3)	16 (94)	15 (88.2)
7	13	12 (92.3)	9 (69.2)	13 (100)	12 (92.3)
8	6	6 (100)	2 (33.3)	4 (66.6)	2 (33.3)
9	8	8 (100)	5 (62.5)	8 (100)	8 (100)
15	1	1 (100)	1 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)
16	3	3 (100)	2 (66.6)	2 (66.6)	2 (66.6)
18	2	2 (100)	1 (50)	2 (100)	1 (50)

El tiempo de exposición del esputo a los diferentes conservadores varió de cinco a 18 días. La mayor parte de las muestras estuvieron en el conservador por 7 días o menos. Resalta que hubo buena recuperación de *M. tuberculosis* aún con muestras que estuvieron almacenadas por 18 días con carbonato de sodio.

Tabla 5. Resultados de la comparación del tiempo de exposición del esputo con cada uno de los agentes químicos probados y los cultivos positivos y negativos de *M. tuberculosis* en LJ

	Carbonato de sodio		Cloruro de cetilpiridinio		Borato de sodio		Control	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
n	50	4	57	1	37	14	28	19
Promedio (Días)	7.58	11.25	7.61	-	7.75	7.28	8.43	7.21
p	0.00		NA		0.41		0.13	

NA= No aplicable

Prueba estadística *t* de student

El tiempo promedio de exposición a los diferentes agentes químicos para que el cultivo fuera positivo varió de 7.58 a 7.75 días

Tabla 6. Resultados de la comparación del tiempo de exposición del esputo con cada uno de los agentes químicos probados y los cultivos positivos y negativos de *M. tuberculosis* en MGIT

	Carbonato de sodio		Cloruro de cetilpiridinio		Borato de sodio		Control	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
n	57	1	41	15	50	7	45	6
Promedio (Días)	7.81	-	7.51	8.8	7.68	9	7.49	6.5
p	NA		0.03		0.009		0.02	

NA= No aplicable

Prueba estadística *t* de student

El tiempo promedio de exposición a los diferentes químicos para que el cultivo fuera positivo varió de 7.58 a 7.81 días

Tabla 7. Resultados de la tinción con auramina-rodamina del esputo expuesto con cada uno de los agentes químicos probados.

Agente químico	n (%)	Negativo n (%)	Positivo n (%)
Carbonato de sodio	58 (100)	5 (8.60)	53 (91.40)
Cloruro de cetilpiridinio	58 (100)	40 (69)	18 (31.00)
Borato de sodio	58 (100)	2 (3.40)	56 (96.60)
Control	58 (100)	1 (1.70)	57 (98.30)

El cloruro de cetilpiridinio altera las propiedades de tinción de *M. tuberculosis*. Solamente el 31% de las muestras fueron auramina-rodamina positiva.

Tabla 8. Resultados de la tinción con Ziehl-Neelsen del esputo expuesto con cada uno de los agentes químicos probados.

Agente químico	(n) %	Negativo n (%)	Positivo n (%)
Carbonato de sodio	58 (100)	5 (8.60)	53 (91.40)
Cloruro de cetilpiridinio	58 (100)	36 (62.10)	22 (37.90)
Borato de sodio	58 (100)	2 (3.40)	56 (96.60)
Control	58 (100)	1 (1.70)	57 (98.30)

El cloruro de cetilpiridinio altera las propiedades de tinción de *M. tuberculosis*. Solamente el 37.9% de las muestras fueron ZN positivo.

12. Discusión

El objetivo de este estudio fue comparar los agentes químicos cloruro de cetilpiridinio, carbonato de sodio y borato de sodio como conservador para almacenar la muestra, disminuir la contaminación en esputo de la flora normal de la boca de pacientes con tuberculosis pulmonar durante su transporte al laboratorio a temperatura ambiente y permitir el aislamiento de *M. tuberculosis*.

El carbonato de sodio mostró muy buena recuperación de *M. tuberculosis* en medio MGIT y en LJ, y se puede considerar como un agente químico apropiado para preservar *M. tuberculosis* en esputo. Cuando se comparó el crecimiento de *M. tuberculosis* en el esputo tratado con carbonato de sodio contra el crecimiento de *M. tuberculosis* tratado con los otros agentes químicos observamos que hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) tanto en medio MGIT como en LJ (Tabla 1 y 2). El carbonato de sodio es una sustancia química alcalina y generalmente es utilizada como un amortiguador y no afecta a *M. tuberculosis*. En un trabajo previo en donde se comparó la colección de esputo durante 72 horas y el esputo colectado durante la mañana para observar si se mejoraba el aislamiento de *M. tuberculosis*, los investigadores utilizaron el carbonato de sodio para retardar el crecimiento de contaminantes en el esputo colectado durante 72 horas y encontraron que la flora normal si disminuye pero la contaminación también es mayor en las muestras almacenadas que en las muestras colectadas durante la mañana.³⁶ En nuestro trabajo, encontramos al carbonato de sodio como un agente que inhibió la flora contaminante y permitió el crecimiento de *M. tuberculosis*. Probablemente la función del carbonato de sodio en el esputo, incluya la neutralización del pH del esputo y evite la sobrepoblación bacteriana de estos microorganismos que durante su metabolismo produce una mezcla de ácidos orgánicos tóxicos los cuales disminuyen el pH y son dañinos para *M. tuberculosis*.

En cuanto al crecimiento de *M. tuberculosis* del esputo que fue expuesto al cloruro de cetilpiridinio observamos mayor recuperación en medio LJ (98.3%) que en medio MGIT. Probablemente esto se debe a que el cloruro de cetilpiridinio es

una sal cuaternaria de amonio, su centro activo debe ser inactivado con un agente quelante como la lecitina presente en el huevo con que se prepara el medio de LJ. Por lo tanto hubo crecimiento de *M. tuberculosis* en LJ en comparación con MGIT que no contiene ningún agente que pueda inactivar el centro activo del cloruro de cetilpiridinio. Por lo tanto es sustancial que cuando se use el cloruro de cetilpiridinio la muestra deberá inocularse en medio de LJ u otro medio que contenga el inhibidor del centro activo. Además se pudo demostrar que con el uso del cloruro de cetilpiridinio no hubo presencia de contaminaciones, pero también se observaron nueve cultivos falsos negativos en medio MGIT, las cuales fueron positivas en el esputo expuesto con el borato de sodio, carbonato de sodio e inclusive en el control, estos resultados apuntan la acción bactericida del cloruro de cetilpiridinio sobre *M. tuberculosis* y se puede considerar que no es un agente químico apropiado para preservar *M. tuberculosis*, en contraparte con otros investigadores que tuvieron resultados en donde no hubo tal efecto. La recuperación con el conservador borato de sodio (86.2%) fue mayor en comparación con el control (77.60%), así como la contaminación con el borato de sodio (12.1%) fue mayor en comparación con el control (10.3%) se piensa que incrementando el número de muestras pueda haber diferencia estadísticamente significativa. Este conservador fue utilizado para preservar *M. bovis* en muestras de tejido con muy buenos resultados hasta con 7 días de exposición.⁴¹

Por otro lado es importante tomar en cuenta que las muestras analizadas en este estudio fueron baciloscopia positiva y la posibilidad de recuperación de *M. tuberculosis* era alta. Sin embargo está pendiente probar si con el esputo de pacientes paucibacilares es posible aislar *M. tuberculosis*. Para ello deberán inocularse dos o más medios de cultivo para incrementar la posibilidad de recuperación de *M. tuberculosis*.

En el esputo control (sin agente químico) se recuperó 48.3% de *M. tuberculosis* y presentó contaminación de 32.8%. Estos resultados se compararon con los resultados de recuperación y contaminación del esputo tratado con alguno de los agentes químicos probados y hubo diferencia estadísticamente significativa. Los resultados del control se deben probablemente a que tanto las muestras control

como las tratadas con los agentes químicos estuvieron expuestas a temperatura de laboratorio (>32°C) de 5 a 18 días. Sin embargo, la proporción de contaminación fue elevada.

Un aspecto importante es el tiempo que pueden permanecer las muestras con el conservador. En nuestro estudio no controlamos los diferentes tiempos de exposición, sin embargo tuvimos muestras que estuvieron expuestas de 5 a 18 días. La tendencia demostró que 7 días es el tiempo máximo de contacto con el carbonato de sodio y el borato de sodio para permitir buena recuperación de *M. tuberculosis* y poca contaminación. Se ha observado en algunos estudios en donde se ha mostrado que el cloruro de cetilpiridinio en solución con cloruro de sodio no altera la viabilidad del bacilo tuberculoso durante un lapso de por lo menos 14 días.⁴⁰

Se encontró que la tinción con auramina-rodamina y la de ZN de las muestras expuestas con carbonato de sodio, borato de sodio y el control fueron positivas en el 91, 96 y 98% respectivamente, en contraste con la tinción de las muestras expuestas con el cloruro de cetilpiridinio, las cuales fueron 31% positivas con auramina-rodamina y 37.9% positivas con ZN. Estos resultados se deben probablemente a que el cloruro de cetilpiridinio es un detergente catiónico, que tiene la función de incrementar la permeabilidad de la célula, de tal manera, que es posible que al decolorar la muestra con el alcohol ácido, éste elimina el colorante, y al observar la muestra al microscopio no se observaron bacilos con ninguna de las tinciones como se muestra en este estudio. Por lo tanto, el cloruro de cetilpiridinio no es un agente apropiado para poder realizar la baciloscopia. Esto contrasta con estudios en donde se informó que la exposición al cloruro de cetilpiridinio no alteraba las propiedades de tinción del bacilo.⁴⁰

En nuestros resultados de la tinción, el control tuvo solamente una muestra no positiva y para los conservadores carbonato de sodio y borato de sodio 5 y 4 muestras no fueron positivas, respectivamente, probablemente porque la baciloscopia directa tenía solo una cruz de bacilos ácido alcohol resistente, y es difícil encontrarlos con esta cantidad. Sin embargo, existen otros factores que

podieron influir para observar la baciloscopia positiva como son: la velocidad de centrifugación, las técnicas de tinción y la experiencia del lector.²⁰

En resumen en nuestro estudio encontramos que el carbonato de sodio fue el mejor agente químico para la recuperación de *M. tuberculosis* con menor contaminación tanto de medios LJ y MGIT. Sin embargo será necesario evaluar este agente en el campo en muestras con baciloscopia negativa y cultivo positivo. Asimismo el carbonato de sodio fue útil para preservar los bacilos para ser observados con las tinciones de auramina-rodamina y la de ZN. Además la ventaja de estos agentes químicos es que no son tóxicos y su costo es bajo

13. Conclusiones

- ❖ El carbonato de sodio permitió mayor recuperación de *M. tuberculosis* en el medio MGIT
- ❖ Se observó arriba del 90% de los frotis positivos con las dos tinciones (auramina–rodamina y ZN) para los conservadores carbonato de sodio y borato de sodio
- ❖ El cloruro de cetilpiridinio es un agente químico bactericida el cual es inhibido por la lecitina. Esto explica por qué observamos mayor recuperación de *M. tuberculosis* cuando la muestra fue sembrada en LJ y no en MGIT
- ❖ Los bacilos ácido alcohol resistentes no se observan en la tinción de auramina-rodamina y ZN con el conservador cloruro de cetilpiridinio.
- ❖ La mejor recuperación de *M. tuberculosis* fue cuando la muestra estuvo en el conservador menos de ocho días
- ❖ Los resultados obtenidos apoyan el uso de estos agentes como medios de transporte de muestras de esputo de lugares distantes a un laboratorio
- ❖ La perspectiva de este proyecto es que posteriormente se realice un estudio prospectivo en el cual se incluyan muestras de esputo de pacientes paucibacilares y se tenga la posibilidad de recuperar el bacilo de *M. tuberculosis*.

ANEXO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Huauchinango, Puebla a ___ de _____ de 200__

A quien corresponda:
Presente.

Yo _____ he sido invitado(a) para participar en el estudio titulado **"La dinámica de la transmisión de la tuberculosis en pacientes con baciloscopia negativa y cepas resistentes de la Sierra Madre Oriental"** que se realiza en forma conjunta por el personal de salud de la Jurisdicción Sanitaria No. 1 de Huauchinango, Puebla e investigadores del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán de la Cd. de México.

Estoy enterado(a) de que se trata de un estudio epidemiológico que busca comprender las formas en que se transmite esta enfermedad en mi comunidad. También he sido informado(a) de que en caso de presentar esta enfermedad se me informará de los resultados de las muestras que de mi se obtengan, y se me realizarán cuatro entrevistas, la primera en el momento del diagnóstico inicial y tres posteriores a los 3, 6, 12 y 24 meses. Reconozco que en este estudio no existe ningún riesgo hacia mi persona, que de ninguna manera mi decisión de participar es obligada y que cualquiera que sea esta decisión, no se verá afectada la calidad de la atención médica que vengo recibiendo y que los resultados de este estudio serán estrictamente confidenciales. También acepto que este proyecto no abarca ningún gasto que resulte del tratamiento de esta enfermedad ni de complicaciones potenciales derivadas del mismo.

Atentamente,

Participante del estudio

Testigo

Testigo

Investigador Principal

Bibliografía

1. American Thoracic Society and Centers for Disease Control. Diagnostic standards and classifications of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:725.
2. Behr MA, Warren SA, Salamon H, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 1999; 353:444-9.
3. Pilheu JA. Tuberculosis 2000: problems and solutions. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2:696-703.
4. Bloom BRaCJLM. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 1992; 257:1055-1064.
5. Brudney K, Dobkin J. Resurgent tuberculosis in New York City. Human immunodeficiency virus, homelessness, and the decline of tuberculosis control programs. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:745-9.
6. Ellner JJ, Hinman AR, Dooley SW, et al. Tuberculosis symposium: emerging problems and promise. *J Infect Dis* 1993; 168:537-51.
7. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR, Jr., Good RC. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* 1993; 31:767-70.
8. Shafer RW, Edlin BR. Tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus: perspective on the past decade. *Clin Infect Dis* 1996; 22:683-704.
9. Sada-Díaz E, J S-O. Tuberculosis. México, 1995.
10. INEGI. Censo General de la Población. Puebla, 1995.
11. Sifuentes-Osornio J, Ponce-de-Leon LA, Camacho-Mezquita FE, et al. [Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican patients. I. Clinical features and risk factors]. *Rev Invest Clin* 1995; 47:273-81.
12. Koneman EW, Allen SD, col a. Diagnóstico microbiológico. *Micobacterias*. Argentina, 1999:867-915.

13. Murray PR, Baron EJ, col. Manual of Clinical microbiology. Mycobacterium. Washington, 1999:399- 437.
14. Grzybowski S, Barnett GD, Styblo K. Contacts of cases of active pulmonary tuberculosis. Bull Int Union Tuberc 1975; 50:90-106.
15. Woodring JH, Vandiviere HM, Fried AM, Dillon ML, Williams TD, Melvin IG. Update: the radiographic features of pulmonary tuberculosis. AJR Am J Roentgenol 1986; 146:497-506.
16. Dannenberg AM, Jr. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. Rev Infect Dis 1989; 11:S369-78.
17. Murray PR, Elmore C, Krogstad DJ. The acid-fast stain: a specific and predictive test for mycobacterial disease. Ann Intern Med 1980; 92:512-3.
18. Woods GL, Pentony E, Boxley MJ, Gatson AM. Concentration of sputum by cyto centrifugation for preparation of smears for detection of acid-fast bacilli does not increase sensitivity of the fluorochrome stain. J Clin Microbiol 1995; 33:1915-6.
19. Smithwick RW, David HL. Acridine orange as a fluorescent counterstain with the auramine acid-fast stain. Tubercle 1971; 52:226-31.
20. Lipsky BA, Gates J, Tenover FC, Plorde JJ. Factors affecting the clinical value of microscopy for acid-fast bacilli. Rev Infect Dis 1984; 6:214-22.
21. Bernard D. Tratado de Microbiologia, 1984:589-602.
22. Wilson ML, Stone BL, Hildred MV, Reves RR. Comparison of recovery rates for mycobacteria from BACTEC 12B vials, Middlebrook 7H11-selective 7H11 biplates, and Lowenstein Jensen slants in a public health mycobacteriology laboratory. J Clin Microbiol 1995; 33:2516-8.
23. Krasnow I, Wayne LG. Comparison of methods for tuberculosis bacteriology. Appl Microbiol 1969; 18:915-7.
24. Sharp SE, Suarez CA, Lemes M, Poppiti RJ, Jr. Evaluation of the mycobacteria growth indicator tube compared to Septi-Chek AFB for the detection of mycobacteria. Diagn Microbiol Infect Dis 1996; 25:71-5.
25. Laszlo A, Handzel V. Radiometric diagnosis of mycobacteria. Eur J Clin Microbiol 1986; 5:152-5.

26. Heifets LB. Rapid automated methods (BACTEC System) in clinical mycobacteriology. *Semin Respir Infect* 1986; 1:242-9.
27. Hui M, Cheung SW, Chan CY, Cheng AF. Rapid identification of mycobacterium tuberculosis complex from Bactec 12B broth cultures originating from non-respiratory secretion specimens: comparison between Accuprobe and in-house polymerase chain reaction. *Pathology* 2001; 33:61-5.
28. Kestle DG, Abbott VD, Kubica GP. Differential identification of mycobacteria. II. Subgroups of Groups II and 3 (Runyon) with different clinical significance. *Am Rev Respir Dis* 1967; 95:1041-52.
29. Kubica GP, Gross WM, Hawkins JE, Sommers HM, Vestal AL, Wayne LG. Laboratory services for mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis* 1975; 112:773-87.
30. Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem* 2001; 47:809-14.
31. Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, Vincent-Levy-Frebault V. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2476-8.
32. Kolk AH, Schuitema AR, Kuijper S, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2567-75.
33. Eisenach KD, Siffford MD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:1160-3.
34. Van Scoy RE, Wilkowske CJ. Antituberculous agents. *Mayo Clin Proc* 1992; 67:179-87.
35. Hawkins JE. Nonweekend schedule for BACTEC drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1986; 23:934-7.
36. Kestle DG, Kubica GP. Sputum collection for cultivation of mycobacteria. An early morning specimen or the 24- to 72-hour pool? *Tech Bull Regist Med Technol* 1967; 37:213-5.

37. Paramasivan CN, Narayana AS, Prabhakar R, Rajagopal MS, Somasundaram PR, Tripathy SP. Effect of storage of sputum specimens at room temperature on smear and culture results. *Tubercle* 1983; 64:119-24.
38. Banda HT, Harries AD, Boeree MJ, Nyirenda TE, Banerjee A, Salaniponi FM. Viability of stored sputum specimens for smear microscopy and culture. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4:272-4.
39. Smithwick RW, Stratigos CB, David HL. Use of cetylpyridinium chloride and sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1975; 1:411-3.
40. Tazir M, David HL, Boulahbal F. Evaluation of the chloride and bromide salts of cetylpyridium for the transportation of sputum in tuberculosis bacteriology. *Tubercle* 1979; 60:31-6.
41. Richards WD, Wright HS. Preservation of tissue specimens during transport to mycobacteriology laboratories. *J Clin Microbiol* 1983; 17:393-5.
42. Ratnam S, Stead FA, Howes M. Simplified acetylcysteine-alkali digestion-decontamination procedure for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1987; 25:1428-32.
43. Block S. S. Desinfection, sterilization and preservation. Principles of antimicrobial activity. Philadelphia, 1991;29-53, 59-63.
44. The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. U.S.A. 1983.