

720560



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

Diferentes Tipos de Mycobacteria y Técnicas
usadas en el Laboratorio para su Identificación

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

Leonor Zúñiga Sosa

1978



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.

TESIS 1978

OR M.T. ~~444~~

443

BCNA _____

PROC _____

TS _____



Con mi eterna admiración y respeto a mis queridos-
Padres:

A ti madre:

Gracias por el apoyo que siempre he recibido.

Gracias por todo el amor que me has tenido.

Gracias por tu guía y sacrificio que me has - i
brindado.

Gracias por creer en mí y por la confianza que-
me has dado.

A ti Padre:

Que aunque estés ausente tenemos tus altos valor
res morales con nosotros.

Porque siempre creíste en mí y porque siempre -
me alentaste a lograr una meta.

Su hija que los quiere.

A mis hermanos:

Por la unión y cariño que siempre ha existido -
entre nosotros y con el eterno agradecimiento -
por lo que siempre me han brindado.

Carmen y Fam.

Consuelo y Fam.

Martha y Fam.

Mary y Fam.

Malena

Lucero

Salvador y Fam.

Javier.

A mi Esposo

Con todo mi amor.

A mi profesora:

ELDA PENICHE QUINTANA

Por el asesoramiento para la realización de esta -
tesis.

A mis Maestros.

A mi Querida Escuela.

A mis compañeros.



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE	OSCAR AMOR DODERO
VOCAL	LEONOR MARTINEZ SOTO
SECRETARIO	ELDA PENICHE QUINTANA
1o. SUPLENTE	NOEMI MONROY DE AMOR
2o. SUPLENTE	OLGA VELAZQUEZ MADRAZO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE QUIMICA

SUSTENTANTE: LEONOR ZUÑIGA SOSA

ASESOR DEL TEMA: ELDA PENICHE QUINTANA

I N D I C E

I. INTRODUCCION

II. GENERALIDADES

- A. Bosquejo Histórico de la Tubercu-
losis.
- B. Clasificación.
- C. Pruebas usadas para la diferen-
ciación.

III. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

- A. Composición química y propieda-
des biológicas.
- B. Proceso de la tuberculosis huma-
na.
 - 1. Pulmonar
 - 2. Renal
 - 3. Meningítica
 - 4. Osea
 - 5. Intestinal
 - 6. Miliar
- C. Mecanismo de la alergia en las -
infecciones tuberculosas. Fenóme-
no de Koch.
- D. Mecanismo de acción de las dro-
gas utilizadas en el tratamiento.

E. Pruebas de sensibilidad.

IV. TECNICAS PARA LA IDENTIFICACION DE -
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.

A. Origen de las muestras.

B. Tratamiento de las muestras.

C. Examen Bacterioscopico.

1. Microscopía fluorescente

2. Ziehl Neelsen

D. Cultivo.

E. Pruebas bioquímicas.

F. Pruebas in vivo. Inoculación en-
animales de experimentación.

G. Pruebas inmunológicas.

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

VI. BIBLIOGRAFIA.

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

Una de tantas miserias que han flagelado a la Humanidad, en todas sus épocas es la tuberculosis, que aún en nuestros días proyecta la magnitud de sus problemas en todos los países del mundo.

Los retos han sido aceptados por los investigadores de todas las latitudes. Muchos de estos retos han sido resueltos de un modo favorable gracias al ingenio y perspicacia de estos investigadores y hombres de ciencia, que con perseverancia han descornado gran parte de sus incógnitas. Pero muchos otros constituyen problemas que siguen siendo motivación de estudio.

Esta recopilación de datos servirá a los estudiantes que inician los primeros pasos en el estudio del aparato respiratorio, igualmente servirán las técnicas y procedimientos que se describen, con especial preferencia a la tuberculosis pulmonar.

El plan general de esta tesis es presentar en unos capítulos y de la manera más sencilla, las adquisiciones básicas para el estudio de la tuberculosis. También se analizan algunos métodos quimioterápicos contra la tuberculosis.

En el capítulo que comprende generalidades, veremos un breve bosquejo histórico de la tuberculosis, el cuál nos dará una visión amplia de lo que es y ha sido esta enfermedad a través del tiempo y como poco a poco el hombre la ha ido venciendo.

Al estudiar los aspectos clínicos, se ha hecho especial hincapié sobre la valoración del proceso tuberculoso, y sobre la composición química de M. tuberculosis, por ser esta la base para la síntesis de las técnicas a utilizar.

Al estudiar la Bacteriología se comprenderá, que el factor etiológico que determina su infecto-contagiosidad, siempre es definitivo para calificar la enfermedad. Existen diferentes técnicas que nos ayudarán a llegar a la tipificación del germen.

La toma de las muestras y el lugar de donde proceden, nos dará las diferentes distribuciones de la población bacilar.

Dentro del mismo capítulo de técnicas para la identificación de Mycobacteria, encontraremos diferentes cultivos y pruebas utilizadas para su identificación, esperando que esta tesis sea de utilidad a mis compañeros estudiantes de la Facultad de Química.

BOSQUEJO HISTORICO DE LA TUBERCULOSIS

LA ANTIGUEDAD

Las enfermedades infecciosas diezaban grandes núcleos de población en la antigüedad. Periódicamente aparecían las "plagas" por descontento de los dioses; intervenía la magia con sus exorcismos, pero la epidemia continuaba.

Tras una larga etapa de cincuenta siglos, la humanidad entró hace apenas cien años en el verdadero conocimiento de las causas de la enfermedad infecciosa gracias al genio de Pasteur.

La tuberculosis, si no a la manera de esas plagas que ocasionaran una gran mortandad, seguramente provocaba también un gran número de fallecimientos sobre todo en su forma pulmonar, puesto que no se tenía idea del concepto de contagiosidad. Los hechos más evidentes de la existencia de la tuberculosis desde la antigüedad más remota se conocen por las exploraciones arqueológicas que han permitido descubrir momias con cifosis, así como huesos humanos y de animales con destrucciones que pueden considerarse de origen tuberculoso.

Se sabe que los chinos e indúes curaban ya a los tísicos mediante reposo y tratamiento higiénico-dietético. Entre los indúes era llamada "enfermedad real".

Los médicos egipcios tenían fama de excelentes (Homero). Cada uno curaba sólo una enfermedad y los había también para las "enfermedades invisibles".

bles", entre ellas la tisis (Herodoto).

LA ERA HIPOCRATICA

Sólo se tienen conocimientos más profundos - cuando llegamos a Hipócrates (460 - 370 a.c.) el - primer médico que describió con evidente sagacidad clínica la evolución de la tuberculosis al señalar sus síntomas hasta llegar a la caquexia, (la tisis o consumación), provocada por una "úlceras del pulmón".

Sin embargo, a veces se incluían en el mismo cuadro clínico otras enfermedades crónicas de esta víscera que producían también consunción.

Sus eminentes dotes de observador se manifiestan en sus aforismos: "Todas las enfermedades aparecen en todas las estaciones, pero algunas son más graves y se presentan más a menudo en ciertas épocas del año. En invierno reinan las pleuresías, las neumonías, las corizas, los males de la garganta, las toses, La tisis sobreviene principalmente entre los diez y ocho y treinta y cinco años.

Esta observación concuerda con los mismos hechos epidemiológicos actuales en todo el mundo - respecto a la tuberculosis.

Hipócrates el padre de la medicina aplicó el nombre de "tisis" a la enfermedad con el significado de "consumación" o "decaimiento" y considerada como incurable. Sus palabras son: "muchos y de hecho la mayor parte, morirán, de los confinados en cama no se de uno sólo que haya sobrevivido mucho-

tiempo. Morían más rápidamente que lo que es común en tales casos. La consunción era la más frecuente de las enfermedades que entonces prevalecían, mortal para muchas personas.

Y describía a los enfermos como sigue: - - -
... fiebres acompañadas de calosfríos, de tipo continuo, sin intermisión completa sino a la manera de semitercianas, más suave y con exacerbación al día siguiente; sudores constantes pero no extendidos al cuerpo entero, extremidades muy frías que se calientan con dificultad; los intestinos alternados, con defecaciones frecuentes biliosas, sin color y dolorosas.

La orina era delgada, sin color no cocida, o gruesa con poco sedimento que no se asienta favorablemente. Los esputos son pequeños, densos, cocidos, expulsados raramente y con dificultad. Y en los que se encontraron los síntomas más violentos no había cocción pero continuaron arrojando materias crudas. Sus caras eran de color desde el principio hasta el fin enrojecidas con inflamación - pronto se consumían y empeoraban, no tenían apetito para ningún alimento, ni sed, estos e refería a las afecciones tísicas.

La descripción de las fases hipocráticas de los tísicos era: "los ojos hundidos, la nariz afilada, las sienas huecas, la piel tensa, las orejas frías, la cara enjuta y descolorida, los párpados lívidos, la boca abierta y los labios pálidos".

GALENO, de Pérgamo (130-200 d.c.), observó - que la tisis es contagiosa y recomendó el aisla-

miento de los enfermos. Afirmó que las personas - que duermen con tísicos en la misma cama, que usan sus ropas y sus sábanas o aquellos que viven durante largo tiempo con ellos contraen la enfermedad.- Quizá fué el primero en señalar lo aeroterapia como recursos terapéutico y mandaba a sus enfermos a las laderas del Vesubio. Aseveró que la "úlceras - del pulmón no puede cicatrizar a causa del incesante movimiento".

LOS SIGLOS XVII Y XVIII

Un conocimiento más verídico de la tuberculosis se obtuvo en el siglo XVII principalmente después de la importante descripción del médico francés Silvio (Francisco de la Boc, 1614 - 1672), respecto a sus hallazgos en cadáveres cuando enseñaba anatomía en Amsterdam y Leyden. Sus frases son una síntesis de la verdad actual: "En repetidas ocasiones ha encontrado en los pulmones tuberculosis mayores o menores que en la disección demostraron - que contenían pus. Creo que esos tuberculos se - transforman completamente en pus y considero que - de esta forma se convierten en cavernas, ya que es - tán limitadas sólo por una cápsula muy delgada. - Considero que la causa de la tuberculosis pulmonar se puede encontrar en estos tuberculos. Estos hallazgos fueron relacionados por Silvio mismo con - los ganglios escrufulosos.

Sus estudios fueron confirmados en Inglaterra por Tomas Willis (1621 - 1675) y en Francia - por Barbeyrac. Otro médico inglés Ricardo Morton - (1637 - 1689) continuó el estudio de la tuberculosis y consideró dieciseis variedades demostrando -

la lentitud de la evolución.

Se atribuye a Pedro José Desault (1738 - - - 1795), el hecho de haber señalado que el esputo es el medio propagador de la tuberculosis. Pedro Mau--riac confirmó después este hecho considerando a la tuberculosis como única y siempre la misma. La teo--ría del contagio continuaba divulgándose.

EL SIGLO XIX

En Inglaterra Mateo Baillic (1761 - 1823), - había precisado que los tuberculos no son ganglios sino una lesión peculiar del tejido pulmonar. Dedi--cándose a la anatomía patológica en Paris, Gaspar--L. Bayle (1774 - 1861), describió seis variedades--clínicas de tisis, con diversas localizaciones en--el cuerpo humano, pero siempre como enfermedad es--pecífica cuyo carácter esencial es la materia ca--seosa (1810).

Aunque confundía la gangrena y el cáncer con la tuberculosis descubrió también la granulia mi--liar que cien años antes había descrito Bonet.

El descubrimiento reciente de la granulación miliar realizado por Bayle y el conocimiento pre--vio de la tuberculosis dió a Laenec la ocasión de--estudiar a fondo esos dos aspectos de las lesiones y los relacionó entre sí estableciendo entre ambas el eslabón constituido por las infiltraciones del--parenquima pulmonar. Determinó así el lazo común - entre aquellos dos tipos de lesiones señalando que la evolución de la materia tuberculosa es idénti--ca: primero la granulación gris que se vuelve ama--

rilla, se reblandece y destruye el pulmón para dar origen a las cavernas. Confirmó de esta manera la hipótesis de Silvio.

En 1846 Herman Klencke había comprobado que la tuberculosis puede ser transmitida al hombre - por la leche de vacas enfermas sin embargo, hasta 1865 se demostró la inoculabilidad de la tuberculosis en esta época eran ya conocidas las investigaciones de Pasteur sobre los seres microscópicos, - los cuales sirvieron de base a Juan Antonio Villemin (1827 - 1892) para el desarrollo de sus experimentos. Tomó muestras de esputo y de materia caseosa de los pulmones y de los ganglios de enfermos - muertos de tisis e inoculó a conejos jóvenes aplicando esos productos por vía subcutánea. Los conejos murieron pocas semanas después con lesiones tuberculosas visibles en muchos órganos. El pulmón - era el asiento principal de las lesiones tuberculosas en todo similares a las descritas en el hombre. Quedó así demostrada la transmisibilidad e - inoculabilidad de la tuberculosis, a la vez que se consideró la teoría unicista de la enfermedad. Con ello quedaba así demostrado el contagio intrafamiliar y caía por tierra la idea de la herencia proclamada desde Hipócrates con la frase "un tísico - nace de otro tísico", en la cual Laennec también - creía. Villemin vió aceptadas sus ideas por algunos, muy discutidas por otros y tuvo también muchos opositores.

LA EPOCA BACTERIOLOGICA

En los años siguientes los conceptos de Luis Pasteur y sus demostraciones sobre el origen micro

biano de las enfermedades infecciosas tomaron incremento. Los gérmenes de algunas enfermedades infecciosas empezaban a ser descubiertos poco a poco, pero el de la tuberculosis permanecía oculto por alguna causa inexplicable.

La gloria de su descubrimiento estaba reservada a Roberto Koch (1843 - 1919), quien ya gozaba de fama por su demostración del origen del carbunco en las esporas que había logrado cultivar para luego reproducir la enfermedad en distintos animales. Sus medios de cultivo para los gérmenes de las infecciones traumáticas y quirúrgicas aumentaron su celebridad.

En 1871, Cohnheim había logrado reproducir la tuberculosis en la cámara anterior del ojo de conejos. Después de numerosos intentos de coloración Roberto Koch pudo al fin descubrir el germen en conejos. El 24 de marzo de 1882 en la Sociedad de Fisiología de Berlín, dió a conocer su sensacional descubrimiento que motivó especulaciones en todo el mundo respecto al tratamiento de la temida pesta blanca. Los postulados de Koch quedaron como base de la investigación bacteriológica.

El bacilo recién descubierto fué objeto de solícitas atenciones y minuciosos estudios sobre sus peculiaridades biológicas, así como de búsqueda de técnicas para su rápida identificación. La propiedad denominada "ácido - alcohol resistente" se debe a Pablo Ehrlich y a Jorge Eduardo Rindfleisch.

El primero demostró en 1882 que el bacilo re

siste a la decoloración por los ácidos diluidos y empleo de la fucsina para colorearlos. El segundo comprobó la resistencia del germen al alcohol.

Esta propiedad permitió a Franz Ziehl y Federico Neelsen, también en 1882 hallar una técnica especial de coloración que permite en pocos minutos demostrar la presencia del germen en cualquier producto. Se modificó así notablemente la primitiva técnica de coloración durante 24 horas mediante soluciones de azul metileno alcalizadas.

El hallazgo del germen confirmó sin lugar a dudas los experimentos de Villamin y reforzó con bases indiscutibles la teoría contagionista que desde siglos antes estaba en la mente de muchos investigadores. Koch mismo, pensó que la tuberculosis, como otras enfermedades infecciosas (difteria y carbunco), debería inmunizar al organismo y en 1890 anunció, quizá prematuramente que había encontrado en la tuberculina un remedio para la enfermedad.

Sin embargo, la aplicación a los enfermos no dió el resultado que el había anhelado. Las dosis excesivas provocaron efectos mortales y desacreditaron su empleo. La profilaxis, por lo tanto, no logró realizarse en la forma que el ideara.

En el siglo XIX la medicina habría de ser para el completo estudio de los pacientes y la confirmación in vivo de las enfermedades. Los rayos X o rayos incógnita como los llamara su descubridor Guillermo Conrado Roentgen (1845 - 1922), fueron dados a conocer a la Sociedad Físico Médica de - -

Wurzburg el 28 de diciembre de 1895.

Estos rayos incógnita o rayos X cambiaron to talmente el curso de la medicina y la cirugía. - - Pronto fueron empleados en la exploración de fracturas, luxaciones, etc. En 1898 Bouchard y Beclere los aplicaron al diagnóstico de las enfermedades pulmonares, con lo que se llegó al conocimiento de la tuberculosis que silenciosamente había hecho es tragos en el pulmón, sin que en los enfermos se en contrara alguna expresión clínica que sugiriera la investigación bacteriológica. Como consecuencia - del nacimiento de la radiología fueron ampliándose los pormenores de la tuberculosis que cada día era mejor conocida. En 1897 Fluegge demostró el contagio de la enfermedad mediante las gotitas de saliva arrojadas por los enfermos al hablar, toser o - estornudar.

En las necropsias se buscaban más datos que arrojaran luz sobre este asunto.

Así fué como Julio Maria Parrot (1829 - 1883), dió a conocer su experiencia obtenida en el Hospital de Niños, donde tantos morían de sarampión, - bronconoeumonía, tosferina, etc.

El estudio minucioso de los cadáveres le per mitió comprobar que había una pequeña lesión paren quimatosa pulmonar y al mismo tiempo una adenopattía traqueobronquial similar a la del pulmón a la que consideró secundaria. En 1876 dió a conocer - sus hallazgos en la Academia de Medicina de Paris: ... "he observado que cuando hay tuberculosis en - los ganglios hiliares del pulmón hay siempre un fo

co en el segmento pulmonar que en estos ganglios y que este complejo es siempre la tuberculosis más antigua del organismo.

Seis años después Koch descubriría el germen causal. Al mismo tiempo que por esos años se hacían esfuerzos para combatir la enfermedad, los estudios progresaban con rapidez. Se llegó a conocer mejor la primoinfección tuberculosa latente gracias a Kuss de París, continuador de los estudios de Parrot y Antonio Ghon (1886 - 1936) anatomopatólogo de Praga quienes dedicaron su inquietud a la investigación de las adenopatías hiliares, el primero (1898), y a la demostración de la lesión parenquimatosa unida a la adenopatía hilar pulmonar el segundo (1912).

El descubrimiento de personas con lesiones tuberculosas insospechadas y confirmadas luego mediante la bacteriología permitió conocer la verdadera condición de salud de los pueblos. Nadie imaginaba la gran cantidad de enfermos tuberculosos que vivían tranquilamente en medio de personas sanas quienes estaban en peligro de ser contagiadas.

El médico suizo Otto Naegeli (1843 - 1922), -dió a conocer la frecuencia de la tuberculosis en un trabajo que asombró por sus cifras. Aunque las dudas persistieron algún tiempo la aplicación de la tuberculina de Koch en escarificación cutánea -dió al pediatra austriaco Clement F. Von Pirquet (1874 - 1929), la forma de comprobar la aseveración de Naegeli.

Todos los enfermos tuberculosis reaccionaban,

aunque tardamente con personas sanas. Esta reacción le permitió comprobar sin lugar a dudas que la infección tuberculosa estaba ya presente en gran parte de la población desde los niños hasta los ancianos en apariencia sanos. En 95% de las personas la reacción tuberculina era positiva.

En 1907 Von Pirquet denominó alergia a esta reacción tardía que desde entonces se empleó como otros procedimientos de diagnóstico unidos al radiológico y al bacteriológico. Más tarde en 1908, Carlos Manteux aplicó la tuberculina por vía intradérmica a diferentes diluciones y obtuvo resultados iguales o superiores. Se llegó de esta manera a establecer un diagnóstico más y más temprano de la tuberculosis, teniendo como base los estudios clínico, inmunológico, bacteriológico y radiológico.

La enfermedad era conocida cada día mejor. Actualmente se emplea el derivado proteínico purificado (PPD). Estas siguen siendo las bases para las campañas emprendidas en todos los países del mundo en su lucha contra el flagelo.

La patogenia de la tuberculosis se iba comprendiendo poco a poco y Carlos Ernesto Kanke (1870 - 1926) emitió por fin su idea (1916) en forma clara y precisa sobre las etapas evolutivas desde la entrada del bacilo al pulmón y la linfangitis consecutiva (complejo primario), la bacilemia ulterior y su terminación pulmonar o en la tuberculosis extrapulmonar. Los estudios anatomopatológicos y radiológicos efectuados en este siglo por Aschoff, Assmann, Simón Puhl y tantos otros investi-

gadores han confirmado la aseveración de Ranke. - Las tres etapas son recorridas por la tuberculosis de la misma manera que la infección sifilítica.

La idea de la profilaxis contra la peste - - blanca, que ya había germinado en Koch continuó en estudio y correspondió a Alberto Calmette (1863 - 1933) y Alfonso Guérin lograr, en 1921, la atenuación de los germenés para crear una vacuna, efectuando pases sucesivos del bacilo bovino en el medio de bilis de buey con patata glicerínada al cinco por ciento.

La vacuna B.C.G. (Bacilo de Calmette Guérin) es empleada ahora como medio de protección en las personas expuestas al contagio de la tuberculosis.

Aunque desde tiempos remotos se ha intentado la curación de la tuberculosis pulmonar mediante - el reposo, la climato terapia y la sobrealimentación, la cirugía con sus diversos procedimientos - logró numerosas curaciones en la primera mitad de este siglo.

En la actualidad, con el descubrimiento de - los antibióticos y quimioterápicos se ha obtenido la verdadera terapéutica etiológica (1945).

Una enfermedad tan compleja como la tuberculosis es ahora bien comprendida. El esfuerzo de - tantos investigadores da al fin frutos.

CLASIFICACION DE MYCOBACTERIA

Mycobacteria:

Las Mycobacteria son microorganismos no móviles, no esporulados, no se tiñen con facilidad pero cuando lo hacen, resisten al cambio de color - con los ácidos (bacilos acidorresistentes). Son aerobios estrictos.

Las formas saprofíticas crecen con rapidez, sobre la mayoría de los medios de cultivo, a 37 y a 22 grados centígrados.

Muchas de las Mycobacteria son las responsables de infecciones pulmonares y cutáneas, al igual que de enfermedades de otros órganos.

Especies:

Mycobacterium leprae.- (Bacilo de Hanson), no ha sido cultivado invitro ni se ha podido transmitir a los animales de experimentación con certeza. En los tejidos humanos infectados ocurre como un bacilo recto o levemente de 2 a 8 Mm de longitud agrupado en masas o haces que son intensamente resistentes a la decoloración con ácidos y en ocasiones muestran tinción de gránulos.

Mycobacterium leprae-murium.- (Bacilo de Stefansky), es la causa de la lepra en la rata, y parece probable que algunos enfermos con lepra humana la hayan adquirido contagiados con el bacilo M. leprae-murium. El organismo en los tejidos de los roedores se semeja a M. leprae, excepto que los ba

cilos intracelulares tienden a estar arreglados en forma aleatoria y no en haces y alrededor de los núcleos y ni desplazándolos como lo hace M. leprae.

A semejanza del bacilo de Hansen, el bacilo de la lepra de la rata no ha podido ser cultivado en forma satisfactoria sobre medios artificiales, pero se ha afirmado que puede ocurrir su desarrollo sobre la membrana coriolantoidea del huevo fecundado de gallina y que ha habido multiplicación de M. leprae-murium, durante la fase inicial del desarrollo en los tejidos de cultivo. Pueden establecer infecciones experimentales en ratas, ratones y cricetos.

Mycobacterium tuberculosis.- (Bacilo de la tuberculosis en el humano), provoca la tuberculosis en el hombre y en ocasiones es transmitido al ganado, monos y perros. La infección puede establecerse en los cobayos pero no en los conejos, cricetos campiranos ni aves de corral. Los bacilos miden de 1 - 4 Mm. de longitud y están dispuestos en masas pequeñas o se hallan aislados y tienden a ser más largos en los tejidos infectados en relación con la longitud que alcanzan en los cultivos de tejidos. En éstos pueden hallarse formas intensamente resistentes a los ácidos, pero también las formas que son resistentes a sustancias no ácidas. Los cultivos por lo general son de color cremoso o amarillento.

Mycobacterium bovis.- (Bacilo de la tuberculosis bovina), es el organismo causante de la tuberculosis en el ganado, el cual es transmisible -

al humano, monos, cerdos y animales domésticos. Es mucho más patógeno para los animales que M. tuberculosis, la infección experimental generalizada - puede ser producida en los cobayos, conejos y cricetos campiranos, pero no en las aves de corral; - es levemente patógeno para las ratas y ratones. - Crece con más lentitud que M. tuberculosis, formando bacilos más cortos y gruesos. Los cultivos por lo general no se pigmentan.

Mycobacterium microti.- (Bacilo de la tuberculosis murina), es el responsable de la tuberculosis natural en el criceto campirano. La infección experimental puede establecerse en ratones, cobayos, conejos o aves de corral. Crece más lentamente que los organismos de la tuberculosis en el humano y de la tuberculosis en el ganado, tiende a ser más largo midiendo hasta 10 μ , es más delgado y tiene forma muy irregular. Los cultivos invariablemente no se pigmentan.

Mycobacterium avium.- (Bacilo de la tuberculosis aviaria), provoca la tuberculosis generalizada en las aves de corral y en las palomas. Puede transmitirse experimentalmente a los ratones, pero no a los cobayos y conejos. Difiere de los tipos de bacilos tuberculosos que atacan a los mamíferos, en que no forma una película en caldo glicerinado. Los bacilos se asemejan a los de los bacilos tuberculosos del ganado, en que son más cortos y gruesos que el bacilo tuberculoso del tipo humano. Los cultivos pueden pigmentarse. Son parecidos a los bacilos Battey del grupo III de Runyon. Ocurre en masas densas de bacilos cortos, intensamente resistentes a los ácidos, tiene una longitud de 1-2

m, intra o extra celulares en su distribución, - localizados en la mucosa y submucosa intestinales, para su cultivo primario, es necesario el enriquecimiento del medio; es costumbre el emplear un extracto de algún mycobacterium, por lo general M. phlei para este fin. Los cultivos primarios se desarrollan con lentitud, pero los subcultivos siguientes son más profusos inclusive hasta en los medios no enriquecidos.

Bacillus de Calmette y Guérain (BCG).- Constituye una cepa atenuada de M. bovis, utilizada en la preparación de la vacuna BCG.

MYCOBACTERIA ATIPICAS.- Contienen un grupo de organismos algunos de los cuales son reconocidos como posibles agentes de la enfermedad cutánea o pulmonar en el humano. Este grupo ha sido clasificado por Runyon (1959) en 4 grupos principales.- Collins (1962) y Marks y Richards (1962), también han clasificado a estas micobacterias en 10 grupos basándose en los requerimientos de su temperatura, desarrollo en medios especiales, pigmentación y sensibilidad o resistencia a la tiosemicarbazona; Marks y Richards sugirieron 7 grupos, basándose en los criterios de Runyon, con la adición de la temperatura relacionada, con la tasa de desarrollo y la sensibilidad a diversos agentes quimioterapéuticos.

GRUPOS RUNYON

Grupo I Fotocromógenos.

Los fotocromógenos comúnmente asociados con-

la tuberculosis, semejan el desarrollo de M. tuberculosis cuando se desarrollan a 37°C en la obscuridad, pero forman colonias más lisas. Al ser expuestos a la luz, adquieren un pigmento brillante de color amarillo después de 6 a 24 horas. Son intensamente positivos en su reacción con la catalasa y producen lesiones orgánicas en los ratones después de inyecciones intravenosas o intra peritoneales. - (M. Kansasii).

Grupo II Escotocromógenos

Los escotocromógenos producen pigmento amarillo o amarillo naranja en la obscuridad, muestran un pigmento de color naranja intenso o rojizo si son expuestos ante la luz continua; las colonias por lo general son lisas; mínima o nula es su patogenicidad para animales de experimentación; ocurre comúnmente como contaminante del agua, pero algunas cepas son agentes productores de linfadenitis, primordialmente en los niños y pueden ser aislados de los pulmones enfermos. (M. scrofulaceum).

Grupo III Generalmente no Pigmentados

Este tipo crece con lentitud a la temperatura ambiente del laboratorio, las colonias son primordialmente lisas y no fotocromáticas; se encuentran variantes rugosas y pigmentadas de color amarillo. Las cepas provenientes de los pacientes con la enfermedad Battey pueden producir lesiones pulmonares en los ratones. Ocurren cepas en el agua y en otros substratos no vivientes y en diversos animales.

M. avium es uno de los miembros del grupo -
III.

Grupo IV Reproductores Rápidos

Maduran a partir de pequeños inóculos a la -
temperatura del laboratorio en menos de una semana
(habitualmente no se pigmentan, el ejemplo típico-
es M. fortuitum). Pueden ocurrir cepas escoto o fo-
tocromógenas.

Algunas Mycobacteria atípicas.- M. kansasii.
Fotocromógeno patógeno, asociado con enfermedad -
pulmonar. El nombre fué propuesto por Haudroy - -
(1955), pero otros nombres han sido usados para -
los organismos que exhiben características semejan-
tes, entre ellos; bacilo amarillo (Buller y Po- -
llack, 1953), Mycobacterium luciflavum (Middle- -
brock 1956) y grupo I de Runyon.

Mycobacterium marinum.- Se han descrito tres
organismos que poseen características semejantes:-
M. balnei, M. marinum, y M. platypoecilus; en la -
actualidad se hallan agrupados juntos bajo el nom-
bre de M. marinum y se incluyen bajo el grupo I de
M. balnei fué aislado a partir de las paredes de -
las albercas y ha sido encontrado en las lesiones-
cutáneas del codo y de la rodilla.

Su temperatura óptima para el aislamiento -
primario es de 30 a 35°C. M. platypoecilus, fué -
aislado de la platija mexicana, (Platypoecilus ma-
culatus).

Mycobacterium scrofulaceum.- Prissick y Ma--

son (1956) dió este nombre al organismos aislado de las adenitis cervicales (escrófulas). Otros organismos semejantes son conocidos como M. marinum. Son bacilos color naranja y escotocromógenos del grupo II de la clasificación Runyon.

Algunos de estos organismos producen enfermedad pulmonar en el humano, mientras que otros llevan una existencia saprofita. Es sensible a 10 microgramos / 1 ml de tiosemicarbazona.

Grupo Avium - Battey.

Constituye el grupo más controvertible de las Mycobacteria atípicas M. avium y el bacilo Battey muestran evidencia de relaciones y los bacilos Battey a menudo se encuentran involucrados en las infecciones pulmonares en el hombre. Otros organismos relacionados son M. gastri y M. terrae.

M. xenopei.- Son patógenos asociados con enfermedad pulmonar. Aunque están ligados con el grupo avium - Battey son más sensibles a la HAIN y a la etionamida.

Originalmente fueron aislados de un sapo sudamericano (Xenopus laevis por Schwabacher 1959).

M. fortuitum.- Patógenos de rápido crecimiento, organismos que no se pigmentan, asociados con la enfermedad en el humano y en los animales, crece a 37°C pero no a 42°C.

M. smegmatis.- Organismo de desarrollo rápido que se encuentra presente en el esmegma del pre

pucio del hombre y de los perros, crece a 37°C y a 42°C pero no se desarrolla a 52°C.

M. phlei.- (Bacilo del pasto Timothy) saprófito de desarrollo rápido, crece a 37°C y 42°C y a 25°C.

M. ulcerans.- Organismos que no se pigmentan y han sido aislados de las úlceras de la piel, crecen con lentitud a 30 - 33°C.

Pruebas Usadas para la Diferenciación de Mycobacteria

Es de importancia primordial que sea seleccionado un grupo de pruebas de escrutinio para diferenciar M. tuberculosis de otras micobacterias.

El segundo criterio para clasificar las micobacterias es que todas las cepas deberían ser nombradas hasta donde fuera posible con importancia - especial para los organismos de significación en - Medicina. Se examinarán los cultivos cada semana y cualquier cultivo que muestre desarrollo se separa para ulteriores investigaciones. Después de 8 semanas de incubación todos los cultivos que no muestran desarrollo y que tienen negativo el frotis, - son reportados como "cultivos negativos". Aquellos que dieron un frotis positivo del cultivo son incubados durante 4 semanas más, o inclusive por mayor tiempo.

Pruebas de Escrutinio para Mycobacteria

Con el aislamiento primario, se prepara una laminilla a partir del cultivo y se tiñe para asegurar que se ha aislado un bacilo ácido - alcohol-resistente. Las pruebas más útiles en un sistema - de escrutinio son aquellas que pueden llevarse a - cabo con un mínimo de reactivos en un tiempo razonable.

Las pruebas recomendadas son:

1. Formas de las colonias sobre el medio de Lowenstein - Jensen.

2. Pigmentación.
3. Desarrollo a 25°C
4. Desarrollo sobre agar nutriente.
5. Prueba de la niacina.
6. Desarrollo sobre medio P.N.B. (Ac. para nitrobenzoico).
7. Prueba de catalasa - peroxidasa.
8. Pruebas de sensibilidad (HAIN).

La forma de la colonia constituye una guía - para identificar el tipo de organismo: M. tuberculosis por lo general produce una colonia rugosa, - las cepas atípicas una colonia de tipo liso o rugoso y las cepas bovinas muestran desarrollo disgónico.

La pigmentación no es producida por M. tuberculosis, aún cuando esté expuesta a la luz y el color típico es de ante. M. kansasii cuando se desarrolla en la oscuridad produce una colonia rugosa no diferenciable de M. tuberculosis.

M. tuberculosis y M. bovis, no se desarrollan a 25°C, a diferencia de la mayor parte de las cepas atípicas; sin embargo, esto depende del tamaño del inóculo y de la longitud de la incubación.

Los reproductores rápidos se desarrollan libremente en agar como medio nutriente. Las otras - micobacterias crecen con mucha lentitud, o no crecen.

La prueba de la niacina resulta positiva en M. tuberculosis y negativa para todas las otras micobacterias, siendo la única excepción alguna reacción positiva ocasional para M. bovis.

En el medio P.N.B. se desarrollan las cepas atípicas, pero M. tuberculosis y M. bovis no crecen. Puede demostrarse actividad de la catalasa peroxidasa en M. tuberculosis cuando resulta sensible a la HAIN, pero cuando se desarrolla resistencia a este fármaco, las cepas pierden ambas características. Las cepas atípicas retienen su actividad catalasa, aún cuando la resistencia esté presente y casi siempre son negativas a la peroxidasa.

Diferenciación de M. tuberculosis de M. bovis.

El examen microscópico de una laminilla de algún cultivo teñido no ayuda a la diferenciación entre las cepas bovinas y las cepas humanas. En el medio de cultivo Lowenstein - Jensen, las cepas bovinas por lo general producen un tipo disgónico de desarrollo y esto puede estimularse por el desarrollo sobre medio que contenga ácido pirúvico. M. tuberculosis produce un tipo eugónico de desarrollo sobre ambos medios.

La niacina es producida por M. tuberculosis, pero M. bovis es negativo en cuanto a la producción de dicha substancia o da una reacción positiva muy débil, por lo cual ésta es una prueba muy útil.

El desarrollo sobre medios que contienen hidraciada del ácido tiofén - 2 - carbónico (T2!!) e hidra

cida del ácido furano - 2 - carbónico (F2H) indica que se trata de bacilo tuberculoso humano o alguna cepa bovina resistente a la HAIN (hidracida del ácido isonicotínico), siempre y cuando las micobacterias atípicas hayan sido excluidas. La falta de desarrollo sobre T2H o F2H indica una cepa bovina-sensible a la HAIN.

La virulencia animal es uno de los métodos - más antiguos usados para la diferenciación entre - las cepas bovinas y las humanas; el cobayo es susceptible a ambos tipos de organismos siempre y - cuando éstos sean insensibles a la HAIN, aunque es to puede variar con los bacilos aislados en dife--rentes partes del mundo; Mitchison y col. (1960) - han demostrado que los bacilos tuberculosos aislados en la India Sudoriental tienen menor virulen--cia para el cobayo que los aislados en Europa.

Pueden usarse conejos para diferenciar las - cepas bovinas de las humanas; el animal deberá ser inoculado por vía intravenosa con un cultivo líquido diluido y se practicará la necropsia después de 6 semanas. La cepa bovina produce una infección generalizada con lesiones del riñón, pero el tipo humo produce escasa enfermedad y no lesiona al riñón.

Los nitratos generalmente son reducidos a nitritos por las cepas humanas pero no por las cepas bovinas.

Mycobacteria Atípicas

La identificación de M. tuberculosis es rela

tivamente sencilla, pero la identificación de las micobacterias atípicas presenta un problema extremadamente difícil.

Durante los últimos 10 a 15 años ha habido - numerosos sistemas descritos para la clasificación de estos organismos; en Inglaterra los métodos de Runyon (1955), Marks y Richards (1962) o Collins - (1962), han sido usados con frecuencia.

No es posible trazar una línea divisoria entre los patógenos y los saprofitos, ya que por - - ejemplo, los patógenos hallados en el grupo IV de Runyon casi no pueden distinguirse de M. phlei y - M. smegmatis. Cualquiera que sea la clasificación - usada, deberá contener por lo tanto un traslazo de organismos saprofitos y patógenos.

Un organismo sólo puede ser considerado patógeno para el humano mediante su aislamiento de tejidos enfermos durante numerosas ocasiones en ausencia de otros agentes causales.

M. Kansasii

Forma: Formación en cordones laxos que pueden aparecer en los cultivos Acido resistentes con intensidad.

Forma de las colonias: La mayor parte de las cepas producen colonias lisas, pero otras muestran la tendencia a ser rugosas, en igual forma que las colonias formadas por M. tuberculosis.

Pigmentación: Produce un pigmento amarillo,-

sólo cuando es expuesto a la luz solar durante su crecimiento. Las variantes de colonias rugosas que se desarrollan en la obscuridad no pueden distinguirse de *M. tuberculosis*.

Temperatura para el desarrollo: El desarrollo a 25°C es lento y puede tomar 3 - 4 semanas. A 37°C ocurre el desarrollo a partir de pequeños inóculos en 1 - 2 semanas. No ocurre ningún desarrollo a 44°C.

Actividad en la catalasa: Por lo general es vigoroso, aún cuando la cepa sea resistente a la isoniacida.

Tiosemicarbazona: Habitualmente sensible a baja concentración.

Patogenicidad: No produce ninguna enfermedad en el cobayo, empleando el inóculo estándar.

M. marinum.

La importancia de este grupo de organismos con respecto a la identificación es que puede confundirse con M. kansasii.

A menudo sintetizan pigmento y éste es fotocromógeno.

Puede distinguirse de M. kansasii mediante la resistencia a la tiosemicarbazona y con las pruebas descritas por Juhlin (1967).

El nitrato reducido por M. kansasii solamen-

te, prueba de la arilsulfatasa positiva con M. marinum y negativa con M. kansasii.

M. scrofulaceum.

Forma: Formación de cordones, habitualmente no se hallan presentes en los cultivos en pendiente.

Forma de las colonias: Casi en forma invariable son colonias lisas, que pueden ser eugónicas o disgónicas.

Pigmentación: Color definido amarillo - naranja, producido cuando crecen en la obscuridad.

Temperatura para el desarrollo: El crecimiento es lento a 25°C, comparado con el desarrollo a 37°C y no ocurre ningún desarrollo a 44°C.

Actividad de la catalasa: Por lo general es moderada, aunque algunas cepas sólo son debilmente positivas, la resistencia a la isoniacida no afecta el resultado.

Tiosemicarbazona: Sensibilidad variable, algunas cepas son ligeramente más resistentes que - M. kansasii, otras muestran resistencia moderada a elevada.

Patogenicidad: No produce enfermedad en los cobayos, usando el inóculo estándar.

Grupo aviarío - Battey

Forma: Formación de cordón presente por lo general, se observan algunas células ácidosresistentes y algunas no resistentes a los ácidos.

Forma de las colonias: Se observan colonias lisas en la mayor parte de las cepas.

Pigmentación: Por lo general no producen pigmento, aunque algunas cepas muestran color amarillo pálido no fotocromógeno.

Temperatura para el desarrollo: El crecimiento por lo general ocurre a 25°C, 37°C y a 44°C, aunque a 25°C es extremadamente lento.

Actividad de la catalasa: Variable, a menudo débil, de la misma intensidad que M. tuberculosis sin que sea afectado por la resistencia a la isoniácida.

Tiosemicarbazona: La mayor parte de las cepas son resistentes a 10 mg/ml.

Patogenicidad: No producen enfermedad en los cobayos, con el inóculo estándar.

Mycobacterium gastrí:

M. gastrí fué aislado originalmente del lavado gástrico y descrito por Wayne (1961).

El desarrollo ocurre en aproximadamente una semana a 37°C sobre medio de huevo y puede obser--

varse la formación de cordones en los medios de cultivo. El cultivo no produce pigmento y las colonias son semejantes al grupo aviario - Battey.

Mycobacterium terrae.

Este organismo fué descrito como el "bacilo-del rábano" por Tichmond y Cummings (1950) y como por lo general se encuentra en el suelo, Wayne le dió el nombre de terrae.

No producen cordones y tampoco producen enfermedad en el cobayo. El crecimiento aparece en una semana o más sobre medio de huevo, las colonias no producen pigmento y se semejan a las colonias del grupo aviario Battey.

Mycobacterim xenopei

Forma: El aspecto morfológico de M. xenopei es de bacilo definitivamente característico a menudo del orden de 8 - 10 m. de longitud.

Forma de las colonias: Por lo general son lisas si se desarrollan en medio húmedo.

Pigmentación: Producen pigmento de color amarillo pálido no fotocromógeno.

Actividad de la catalasa: Variable.

Temperatura para el desarrollo: Crecimiento a 37°C y a 44°C.

Tiosemicarbazona: Por lo general son resis--

tentes a la HAIN. Menor resistencia que la mayor - parte de las micobacterias atípicas. De manera habitual son sensibles a 0.4 mg/ml de HAIN.

Patogenicidad: No patógenos para el cobayo, - empleando el inóculo estándar.

Mycobacterium ulcerans.

Aislado de ulceraciones cutáneas.

Crece a 30 - 35°C sobre cultivos primarios.

Quizá puede estar relacionado con el grupo - aviario - Battey de organismos que no se sintetizan pigmento.

Por lo general resistente a la tiosemicarbazona.

Mycobacterium fortuitum.

M. fortuitum tiene una gama de temperaturas - para su crecimiento de 20 - 37°C, no se desarrolla a 44°C y esto ayuda a que se le pueda distinguir - de otros organismos de rápido desarrollo.

En los cultivos se puede observar la forma-- ción de cordones con la mayoría de las cepas.

Por lo general no sintetizan pigmento.

Las colonias pueden ser lisas o rugosas.

Es positivo a la catalasa.

No produce ninguna enfermedad en los cobayos usando el inóculo estándar.

La mayor parte de las cepas no resistentes a

tiosemicarbazona.

Puede usarse la prueba de la arisulfatasa como método de 3 días para distinguirlo de M. smegmatis y M. phlei.

Mycobacterium smegmatis.

Es una bacteria de rápido desarrollo del tipo Grupo IV de Runyón.

Puede distinguirse de M. fortuitum por su desarrollo a 44°C y una prueba negativa de 3 días ante la arisulfatasa.

Por lo general se encuentra como saprófito, - con o sin pigmentación y es resistente a la tiosemicarbazona.

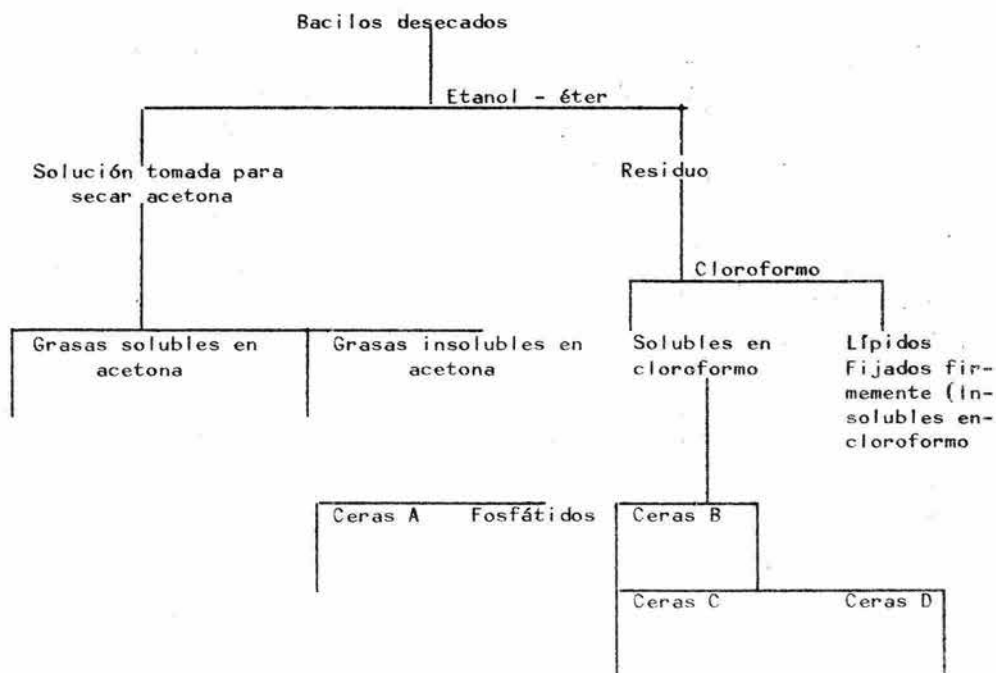
Mycobacterium phlei.

Es miembro del grupo de reproductores rápidos de micobacterias, el desarrollo ocurre en una amplia gama de temperaturas (20-52°C) y el desarrollo a 52°C es usado para distinguirlo de M. fortuitum y M. smegmatis. Algunas cepas producen un pigmento amarillo pero no son fotocromógenas. Por lo general son resistentes a la tiosemicarbazona.

Composición Química y Propiedades Biológicas de
Mycobacterium Tuberculosis

La característica más sorprendente de las Mycobacteria es su alto contenido en lípidos, con cantidades que oscilan entre el 20 y 40% de su peso seco.

En el siguiente esquema se muestran varias fracciones-lípidos, definidas por las condiciones utilizadas para su extracción a partir de organismos desecados:



En la siguiente tabla se da la distribución de los lípidos subcelulares (de células normales desintegradas):

<u>Fracción</u>	<u>Soluble en</u> <u>Etanol - -</u> <u>Eter</u>	<u>Soluble en</u> <u>Cloroformo</u>	<u>Fijados en</u> <u>F.</u>	<u>Total</u>
Células intactas	8.0	7.6	12.1	27.7
Pared celular	17.2	21.4	22.5	61.1
Pequeñas partículas	14.4	3.4	5.9	23.7
Soluble	4.7	2.5	2.0	9.2

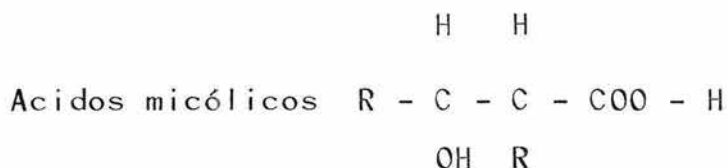
La sorprendente abundancia de lípidos en la pared celular, explica el carácter hidrófobo de los organismos, que se muestran por su tendencia a adherirse unos a otros durante el crecimiento en medios acuosos, y a flotar en la superficie a pesar de añadir al medio, sustancias detergentes como Tween 80, que facilitan la dispersión. La riqueza en los lípidos de la pared, probablemente puede explicar también algunas de las otras propiedades de las Mycobacteria, por ejemplo, la relativa impermeabilidad a los colorantes, la resistencia a la acción letal de los ácidos y los álcalis y la resistencia a la acción bactericida de los anticuerpos, junto con el complemento. La enorme cantidad de lípidos en-

la pared puede contribuir también a la lentitud de crecimiento, tanto al dificultar el paso de las - sustancias nutritivas al interior de la célula, - como al consumir gran parte de la capacidad biosintética de ésta.

Entre los lípidos extraídos con disolventes- orgánicos neutros se encuentran las ceras (ésteres de ácidos grasos con alcoholes y los glucolípidos- denominados también micósidos) compuestos lípidos- solubles en los cuales los lípidos y los carbohi-- dratos se hallan closados por uniones convalentes. Aparte, las Mycobacteria poseen ceras verdaderas.

Aunque se encuentran ácidos grasos diferen-- tes en los lípidos de las Mycobacteria uno de és-- tos, el ácido micólico, parece hallarse sólo en estos organismos. Estos ácidos grasos, grandes, saturados con ramificaciones A y B hidroxiladas, se encuentran tanto en las ceras como en los glucolípidos.

Estructuras de algunos lípidos característicos de las Mycobacteria:



R tiene alrededor de 50 átomos de C, 1 ó 2 - átomos de O y es probablemente variable en los diferentes ácidos micólicos.

Los lípidos han sido bien estudiados por An-

derson y colaboradores, además de la grasa neutra, se pueden distinguir dos tipos:

1. Fosfolípidos, que contienen ácidos grasos saturados y no saturados incluyendo los bien conocidos palmítico y esteárico, juntamente son peculiares en este microorganismo, el ácido - - phtóico, isómero del ácido esteárico.
2. La cera D, contiene polisacáridos (manosa, arabinosa y galactosa) una cera blanda que es un glicérido complejo y una cera insaponificable-ácido - resistente, que contiene el ácido micólico (que es el único constituyente ácido resistente del bacilo), un alcohol llamado phtiocerol y un ácido mycocerorósico.

En las grasas neutras se encuentra una pigmento amarillo denominado phtiocol que es una - - sustancia idéntica a la vitamina K, excepto la - - sustitución de un hidroxilo en el tercer carbono.

Los fosfátidos de Anderson solubles en el alcohol-éter e insoluble en acetona son sales de sodio, calcio y de magnesio del ácido inositoglicero fosfórico, ligados a poliósidos y varios ácidos - grasos particularmente el phtioico y el tubérculo-esteárico. Estos fosfátidos constituyen al antígeno metílico de Boquet y Negre que provoca la aparición de anticuerpos fijadores de complemento.

En emulsión (coadyuvante de Freund) la cera-D a semejanza del bacilo tuberculoso total estimula la inmunogenicidad de diferentes antígenos añadidos. Más aún, una mezcla de cera D y proteínas -

del bacilo tuberculoso, induce una hipersensibilidad de tipo retardado a la tuberculina mientras - que la proteína sola es debilmente inmunogénica.

La fracción fosfátida no purificada tiene la propiedad de evocar una respuesta celular semejante a la del bacilo tuberculoso.

Factor Cordón. La asociación de la virulencia formando serpentinas condujo a la búsqueda, en las bacterias, de un componente de superficie causante de ambas propiedades. Bloch, extrajo de las cepas virulentas con éter de petróleo, una substancia denominada factor cordón considerada como responsable de ambas características: Las células después de la extracción, habían perdido su virulencia y podrían dispersarse fácilmente en medios - acuosos. El factor cordón ha sido identificado como un micósido, 6, 6, - dimicol; 1 trehalosa.

Diferentes pruebas relacionan el factor cordón con la virulencia:

1. Esta substancia es tóxica: inhibe la migración de los leucocitos polimorfonucleares normales in vitro (como lo hace el bacilo tuberculoso - virulento), y mata al ratón tras la administración subcutánea de 10 mg.
 2. Es más abundante en cepas virulentas.
 3. Su extracción vuelve a las células no virulentas (aunque permanezcan vivas).
- A. El bacilo tuberculoso obtenido tras pases repetidos en animales o de cultivos jóvenes, es -

más virulento y posee un mayor contenido en factor cordón, que las células de la misma cepa de cultivos viejos.

El factor contribuye probablemente de un modo sustancial, a la acción patógena.

Se ha demostrado también que otros lípidos extraídos de las Mycobacteria también son tóxicos para los macrófagos.

También parece abundar más en las cepas virulentas que en las avirulentas un lípido que contiene un grupo ácido sulfónico (sulfolípidos) que ha podido extraerse con hexano de organismos intactos. El compuesto aislado fija el rojo neutro y ello explicaría la unión de ese colorante con el bacilo tuberculoso virulento.

Acidorresistencia. - Después de hacer una extracción exhaustiva de los lípidos con solventes orgánicos, los residuos son aún ácido-resistentes y retienen en gran cantidad lípidos fijados firmemente a la pared. Estos lípidos pueden eliminarse con ácidos en caliente, que además destruyen la acidorresistencia, aunque esta propiedad puede perderse por destrucción sónica de las células normales, parece depender de la integridad de la pared celular y de ciertos lípidos.

Estructura Antigénica. - Solo se han efectuado intentos limitados de analizar y clasificar los bacilos tuberculosos en relación con su estructura antigénica. El antígeno protéico que causa hipersensibilidad a la tuberculina se ha localizado en-

una fracción de la pared. Se han observado anticuerpos frente a la fracción fosfátida; pero los anticuerpos frente a los lípidos de las *Mycobacteria*, en general han sido poco considerados. Los anticuerpos frente a las fracciones polisacáridas se inducen en los animales inyectando bacilos tuberculosos vivos o muertos por el calor, pero no por inyección del polisacárido aislado. Como el bacilo intacto absorbe los anticuerpos antipolisacáridos, estos antígenos sin duda se hallan situados en la superficie de la célula.

Las reacciones de aglutinación, las pruebas de fijación de complemento con diferentes fracciones y las pruebas de la tuberculina pueden diferenciar diversas micobacterias patógenas y saprofitas, aunque hay importantes reacciones cruzadas.

Por lo que respecta a sus necesidades nutritivas, el bacilo tuberculoso necesita imprescindiblemente oxígeno, carbono, nitrógeno, hidrógeno, fósforo, magnesio y potasio.

El cloro y el sodio son útiles, así como el hierro a pequeñas dosis y el azufre en cantidad mínima. En cuanto al oxígeno, ya hemos señalado que es aerobio; la riqueza del cultivo obtenido es función de la cantidad de oxígeno consumido. Las necesidades en nitrógeno las satisface muy bien a base de aminoácidos, sales amoniacales y amidas. La fuente de carbono está representada por la glicerina, así como por la glucosa y la levulosa. Por último el agua es un elemento nutritivo, y el bacilo crece mejor en atmósfera húmeda; sin embargo bajo la superficie de una capa líquida el cultivo no se

desarrolla, por lo que se precisa depositar la semilla en la superficie.

Resistencia a los Agentes Químicos y Físicos

Los bacilos tuberculosos son extremadamente resistentes a los ácidos y álcalis, propiedad que se emplea para el aislamiento y diagnóstico de los organismos. También son relativamente insensibles a los detergentes catiónicos. Sin embargo no son más resistentes que otras bacterias no esporuladas al calor, a la irradiación ultravioleta o al fenol.

Conservados en el laboratorio y en la obscuridad, la vitalidad de los cultivos es muy grande, pues al cabo de varios meses, las resiembras son positivas y el cultivo virulento, conservados en la estufa disminuye más pronto. En los esputos húmedos, el bacilo se muestra muy resistente soportando una temperatura de 75°C durante media hora. En esputos desecados a la temperatura ambiente se conservan vivos durante varios meses y resisten más de 7 horas a 70°C . En el polvo de la calle resisten 10 días. La luz solar actúa como un verdadero desinfectante y de todas las zonas del espectro es la ultravioleta la más activa, pero en capa gruesa, como está el bacilo en los esputos, se conserva vivo durante el tiempo dicho y a las condiciones y temperatura del ambiente.

Proceso de la Tuberculosis Humana

Tuberculosis Primaria

En el sujeto no inmune, los bacilos tuberculosos pueden entrar por diversas rutas: pulmón, - conducto gastrointestinal y por inoculación cutánea o percutánea directa (como un accidente en la mesa de autopsia).

Para fines prácticos, la vía de mayor importancia es la vía pulmonar. La mayoría de las lesiones primarias se localizan en los dos tercios inferiores de los pulmones, donde la ventilación es mejor y por lo tanto es mayor la exposición al aire inspirado contaminado. Como no producen toxinas y no hay reacción tisular, los bacilos tuberculosos al principio no encuentran ningún obstáculo para su multiplicación. Llegan a los ganglios regionales (hiliares) e incluso a la sangre antes de que su proceso se vea inhibido por la adquisición gradual de inmunidad específica durante un período de varias semanas. Para entonces, se desarrolla la característica reacción tisular con granuloma de células epitelioides y necrosis con caseificación de la lesión primaria, los ganglios linfáticos regionales y cualquier otro sitio a donde los bacilos se hallan diseminado. La cantidad de bacilos disminuye en forma drástica con la aparición de necrosis caseosa, lo cual sugiere que el proceso de caseificación es importante en la defensa del huésped. Después, la evolución habitual de la infección primaria es hacia la curación mediante una combinación de resolución, fibrosis y calcificación.

Etapa Secundaria

En la evolución de la infección primaria, - los bacilos tuberculosos llegan a la circulación - general en cantidad variable, ésto se traduce únicamente en fiebre y síntomas leves y se le diag - nos tica únicamente como tuberculosis solo cuando se - tiene al paciente en observación a causa de una ex - pos i ción reciente a la tuberculosis. Esta etapa es importante en la patogenia de la tuberculosis por - que es cuando el bacilo llega a sitios distantes - para formar focos metastásicos de infección que - son los sitios a partir de los cuales se produce - la tuberculosis crónica post-primaria.

Aunque es de suponer que los bacilos llegan - a todos los órganos en la etapa secundaria, con - frecuencia producen lesiones únicamente en sitios - limitados que tienen una característica en común, - una elevada tensión de oxígeno de todo el organis - mo y es el sitio donde con mayor frecuencia se en - cuentran focos metastásicos importantes: En ocas - io nes tales focos metastásicos progresan y producen - tuberculosis destructiva en poco tiempo, pero con - mayor frecuencia la aparición de inmunidad especí - fica, hace que la lesión mejore cicatrice y se - - vuelva latente. Estas cicatrices apicales local - iza das, se denominan focos de Simón.

Otros sitios en los que pueden formarse con - cierta frecuencia lesiones metastásicas a distan - cia son el riñón, el cerebro, la columna vertebral y los huesos largos. Las lesiones de los ganglios - linfáticos se deben probablemente a una siembra - profusa llevada por drenaje local del sitio de in -

fección primaria.

Infección Inactiva (latente)

Siempre que una lesión tuberculosa sana, la infección entra en una fase latente en la cual persiste la infección sin producir enfermedad. La infección latente puede permanecer toda la vida pero puede transformarse en una enfermedad activa en cualquier momento.

Etapa Terciaria, Tuberculosis Postprimaria

La tuberculosis fibrocásica crónica, puede sobrevenir siempre que persista una lesión latente. El sitio más común es la porción apical del pulmón. En esta etapa es rara la invasión por vía sanguínea; la enfermedad se caracteriza por áreas circunscritas de inflamación, necrosis con abundantes bacilos y proliferación de tejido fibroso.

Sintomatología

1. Infección Primaria.- La tuberculosis primaria no complicada, frecuentemente no produce enfermedad clínica de importancia. El período de incubación es de 4 a 6 semanas, desde el momento de la inoculación hasta la aparición de ligera fiebre y malestar y de hipersensibilidad a la tuberculina. Los síntomas de ordinario desaparecen sin tratamiento específico porque se produce suficiente inmunidad específica. La diseminación hematogena general es más común en los niños muy pequeños. La tuberculosis primaria puede producir pleuresia con derrame pleu-

ral, linfadenitis cervical, tuberculosis miliar y meningitis.

II. Tuberculosis Postprimaria

A). De los Pulmones.- La tuberculosis pulmonar crónica puede seguir directamente a una infección primaria o bien sobrevenir después de un período breve, largo, o muy prolongado de latencia. Las principales características de la tuberculosis postprimaria son:

- 1). Falta de exposición reciente a un caso de tuberculosis manifiesta.
- 2). Tendencia a la cronicidad con necrosis y licuefacción.
- 3). Producción de tejido fibroso de reparación.

Síntomas: En la mayoría de los casos, el principio de la tuberculosis pulmonar crónica es insidioso y el paciente puede encontrarse totalmente asintomático.

Los primeros síntomas son generales y son:

- a) Elevación de la temperatura entre 39 y 39.5°C.
- b) El paciente puede sentir fatiga y malestar.
- c) Pérdida de peso, cefalalgia (especialmente por las mañanas).

- d) La tos es frecuente pero no invariable y con frecuencia se le considera "tos de fumador".
- e) Cuando se produce esputo por lo general carece de olor, es generalmente verde o amarillo y se produce principalmente por las mañanas al levantarse. La tos puede acompañarse de hemoptisis y habitualmente el esputo tiene estrías de pequeñas cantidades de sangre.

Complicaciones de la Tuberculosis Pulmonar

- a) Cavitación.- Cuando las lesiones nodulares de la tuberculosis se vuelven activas, se forman áreas de necrosis líquidas cuando la necrosis afecta un pequeño bronquio, el material líquido escapa al interior del árbol bronquial y es expectorado dejando una cavidad en el parénquima pulmonar. En esta etapa el esputo generalmente contiene muchos bacilos tuberculosos.
- b) Hemoptisis.- En la mayoría de los casos de hemorragia pulmonar en tuberculosos, la sangre brota de una ulceración de la mucosa bronquial y se manifiesta como estrías de sangre roja brillante en el esputo.
- c) Hay un tipo de hemorragia pulmonar que implica un pronóstico muy diferente cuando la sangre es abundante y oscura (san-

gre venosa) generalmente brota de una rama de la arteria pulmonar en la pared de una caverna y se produce la aneurisma de Rasmussen. La mayoría de los pacientes - en que ocurre ésto, mueren por anemia - aguda antes de poderse intentar un tratamiento.

- d) Pleuresía con Derrame.- La pleura que recubre una lesión tuberculosa puede resultar afectada ocasionando dolor a la inspiración "dolor de costado". Las adherencias fibrosas entre las hojas visceral y parietal son generalmente los únicos residuos de esta pleuresía seca. La ulceración de un pequeño foco caseoso subpleural a través de la pleura visceral produce pleuresía con derrame en un huésped - hipersensible.
- e) Neumonía Tuberculosa.- El comienzo de la tuberculosis es en ocasiones bastante - agudo, simulando una neumonía bacteriana. Esta forma de tuberculosis se ve con mayor frecuencia entre los negros, las personas con diabetes, los niños con una infección primaria intensa, y en ancianos - en quienes los pulmones se encuentran - inundados con bacilos expulsados de un - área de necrosis líquida.

Puede haber escalofríos, fiebre, tos productiva y dolor torácico de tipo pleurítico. El frotis por lo general revela muchos bacilos tuberculosos.

- f) Fístula Broncopleural y Empiema.- Cuando una gran lesión caseosa se abre paso por erosión hacia el espacio pleural, la gran contaminación frecuentemente produce empiema tuberculoso. El mecanismo es el mismo que en la producción de derrame pleural exudativo, pero la extensión de la contaminación es mucho mayor. La lesión caseosa puede también perforar un bronquio, dando lugar a una fístula broncopleural además del empiema.
- B). Tuberculosis Renal.- Después de los lóbulos pulmonares superiores, los riñones son el sitio más común de aparición tardía de infección tuberculosa circunscrita. El mecanismo de infección es por diseminación hematógica en el momento de la infección primaria. La tensión del oxígeno en la porción cortical del riñón se aproxima a la de la sangre arterial, lo cual estimula el desarrollo y la supervivencia de bacilos tuberculosos durante largos períodos. Algunos focos de tuberculosis pueden permanecer latentes durante muchos años y producir una enfermedad clínica posteriormente.

Los cambios tisulares son esencialmente los mismos encontrados en el pulmón: Se forma una área de inflamación seguida de caseificación, licuefacción y salida del material contaminado al sistema colector y de ahí al ureter hasta la vejiga; en el hombre puede localizarse hasta el apa

rato genital.

Los síntomas de infección renal son generalmente insidiosos y con frecuencia pasan inadvertidos hasta la aparición de cistitis o epididimitis. La hematuria y la piuria microscópica en la orina estéril en un cultivo común, deben siempre hacer pensar en tuberculosis, debiéndose efectuar una prueba cutánea con tuberculina. Si esta resulta positiva hay que examinar la orina en busca de bacilos tuberculosos. En varias ocasiones puede producir hematuria macroscópica indolora a partir de una cavidad en el riñón antes de que se haga el diagnóstico adecuado. El tratamiento consiste en régimen de varios medicamentos incluyendo estreptomycinina e isoniacida.

- C). Meningitis Tuberculosa.- La tuberculosis puede afectar las meninges ya sea como parte de la tuberculosis miliar o por reactivación o extensión de la infección a partir de un antiguo foco dentro del cerebro.

En las áreas donde es grande la frecuencia de tuberculosis, la mayor frecuencia de meningitis tuberculosa corresponde al primer año de la infección. En las áreas donde dicha frecuencia es baja, la meningitis se observa más comúnmente entre los adultos por reactivación de viejas lesiones latentes. En cuanto a su aspec-

to anatomopatológico las meninges tienen pequeños tubérculos y un exudado fibrinoso en la base del cerebro.

Los síntomas consisten en cefalalgia, inquietud e irritabilidad acompañada generalmente por fiebre, malestar, sudoración nocturna y pérdida de peso. La náusea y el vómito pueden ser signos de importancia. En la punción raquídea se encuentra aumento de presión, el líquido es claro y tiene aumento de proteína y reducción de glucosa, de 100 a 1000 leucocitos del 80 al 95% de ellos son linfocitos. Si se deja reposar el líquido en un tubo de ensayo durante toda la noche puede formarse una fina película de proteína. El frotis de esta película puede mostrar bacilos ácidos resistentes, pero con frecuencia hay que cultivar el líquido para aislar los microorganismos. El diagnóstico diferencial comprende: Carcinomatosis de las meninges, meningitis por hongos y meningitis mal tratadas.

Es urgente obtener el diagnóstico correcto porque el tratamiento específico es muy efectivo sólo si se administra tempranamente en el curso de la enfermedad.

- D). Tuberculosis Osea.- Cuando la infección primaria ocurre en la niñez, la actividad metabólica y la elevada tensión de oxígeno en la línea epifisiaria aumentan la posibilidad de implantación de baci-

los en el tejido óseo por vía hematógena. La mayor frecuencia de artritis y ostiomelitis tuberculosa corresponde a los 3-primeros años de una infección primaria en la infancia pero pueden producirse recrudescencias tardías. Las articulaciones más comúnmente afectadas son: la cadera, la rodilla, el codo y la muñeca. - Un traumatismo puede precipitar la activación tardía de la infección latente.

La implantación de bacilos en las vértebras puede efectuarse por vía hematógena (Si la infección se presenta antes del - cierre de la epífisis) o por disemina---ción de la infección a partir de un ganglio linfático contiguo que drena una - pleuresía o un empiema tuberculoso como en el caso de la tuberculosis de los huesos, la lesión puede no observarse radiográficamente hasta ya avanzado el curso de la enfermedad.

El disco intervertebral se destruye antes y el estrechamiento de un espacio en la radiografía lateral de la columna puede - ser la única anomalía apreciable.

- E). Tuberculosis Gastrointestinal.- El con--ducto gastrointestinal es relativamente resistente a la tuberculosis, pero en el padecimiento pulmonar cavitario avanza--do, que se acompaña de excreción de numerosos bacilos en el esputo, el conducto--gastrointestinal generalmente se infecta

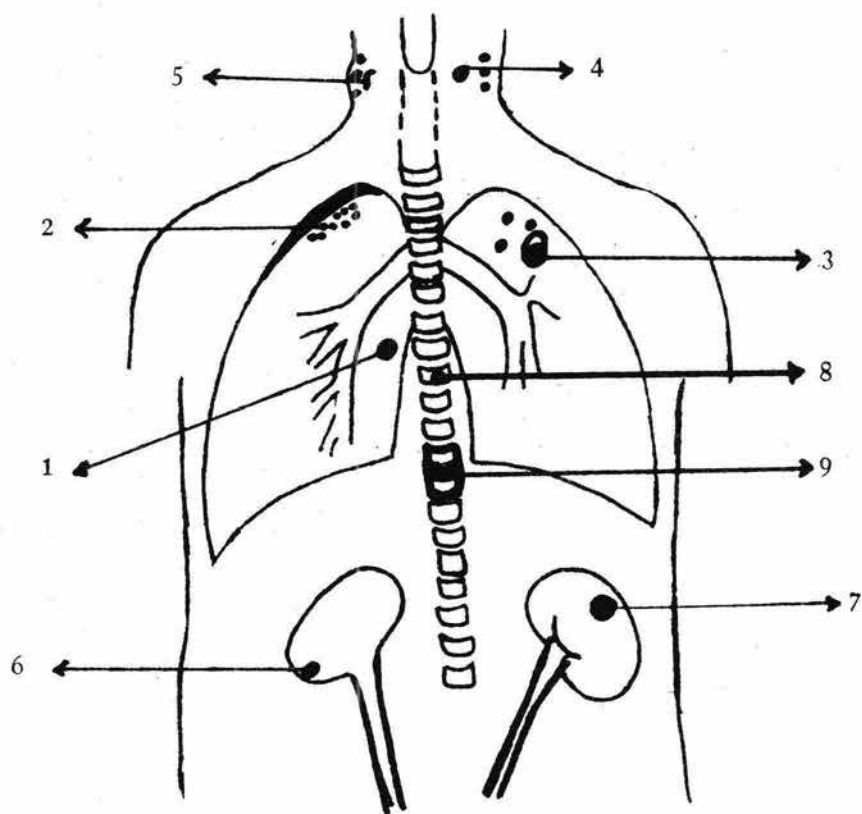
a nivel de la región ileocecal. Los síntomas consisten principalmente en dolor abdominal intermitente, cólico abdominal y diarrea. En ocasiones la infección se propaga por la pared del intestino y provoca peritonitis tuberculosa.

- F). Tuberculosis Miliar.- Cuando un foco caseoso líquido vacía su contenido en una vena, se produce una diseminación general de bacilos tuberculosos por todo el cuerpo. Los mecanismos de defensa resultan insuficientes y se forman tubérculos en todos los órganos del cuerpo. Sin un tratamiento específico la muerte es casi inevitable.

La tuberculosis miliar es la forma más temible de la enfermedad. Puede ocurrir poco después de la infección primaria - con el microorganismo, o por reactivación de un antiguo foco de la enfermedad. La resistencia del organismo a la infección es vencida permitiendo la invasión de todos los órganos del cuerpo. Las lesiones se localizan comúnmente en el hígado, bazo, médula ósea y meninges. Una de las mejores pruebas diagnósticas para la tuberculosis miliar es la biopsia de hígado, de ganglios linfáticos o de médula ósea para buscar los pequeños granulomas caseosos.

Generalmente los síntomas no son específicos y consisten en pérdida de peso, de

bilidad, síntomas gastrointestinales, fiebre y sudoración. La tos no es una característica importante pero sí puede ser la disnea. Por lo general no se llega al diagnóstico sino varias semanas después de la diseminación, cuando en la radiografía se puede apreciar la aparición del típico aspecto miliar, la cifra leucocitaria puede ser normal, baja o elevada o tener un patrón "leucemoide". Posiblemente la característica más prominente en la sangre sea el que disminuye la proporción entre monocitos y linfocitos. Es muy importante establecer un diagnóstico específico porque el mismo cuadro puede presentarse en: Histoplasmosis, coccidioidomicosis, blastomicosis, criptococosis y otras infecciones crónicas.



Localizaciones más frecuentes de la infección tuberculosa.

1. Infección primaria calificada y curada en el pulmón derecho y en el hilio (complejo de Ghon).
2. "Casquete apical" y cicatrices modulares (foco de Simón) en el lóbulo derecho superiores debidos a diseminación hematógica durante la infección primaria.
3. Recrudescencia y coalescencia del foco de Simón con producción de inflamación crónica y necrosis caseosa (cavitación).
4. Foco latente tuberculoso en los ganglios linfáticos cervicales, diseminación a través del drenaje linfático durante la infección primaria.
5. Tuberculosis activa en los ganglios linfáticos cervicales, con producción de inflamación y necrosis caseosa.
6. Foco latente de tuberculosis en el riñón; diseminación durante la infección primaria.
7. Recrudescencia de un foco renal latente con producción de inflamación y necrosis caseosa. El conducto genital masculino puede infectarse con bacilos provenientes de la cavidad renal.
8. Foco latente de tuberculosis en una vértebra.
9. Recrudescencia de un foco vertebral, con producción de inflamación y necrosis caseosa con destrucción del disco intervertebral.

Mecanismo de alergia en las infecciones tuberculosas.

El punto de partida del estudio de la alergia en la tuberculosis es el llamado "Fenómeno de Koch" y consiste en lo siguiente:

Se sabe que la inoculación de bacilos tuberculosos, bajo la piel del cobayo queda durante largo tiempo sin efectos perceptibles. Tienen que pasar unas 6 semanas para que se observe la aparición de un nódulo local acompañado de hipertrofia de los ganglios que lo rodean, este nódulo se ulceraba formandose una lesión que persiste hasta la muerte del animal. Pero si en lugar de inyectar a un cobayo normal inyectamos un cobayo que ya haya estado anteriormente en contacto con el bacilo tuberculoso, entonces los efectos de la inoculación son completamente distintos. Desde el día siguiente se tiene la formación de un absceso local que vacía rápidamente su contenido, cura y cicatriza en unos días sin que los ganglios sufran modificación aparente alguna.

Por lo tanto se observa en el cobayo tuberculosos una reacción viva y precoz, cuya rápida curación contrasta con la evolución lenta y progresiva de la lesión producida en el animal que se infecta por primera vez.

La inmunidad adquirida de esta experiencia revela indiscutiblemente que es claramente insuficiente para detener el desarrollo y evolución de los microorganismos introducidos con la primera inoculación y ya profundamente implantados en el

organismo; indudablemente hace más lenta la evolución de la enfermedad pero no logra hacerla regresar al menos en el cobayo.

Por otra parte, la intensa reacción local - que se produce por la segunda inyección en el animal tuberculoso, entra dentro del cuadro de la e-alergia y este cuadro se produce no tan solo con la inoculación de bacilos sino también con la inyección de productos solubles de los mismos; la tuberculina no se comporta como las toxinas ya que es prácticamente inofensiva inoculada a un animal sano y sólo ejerce sus efectos en el organismo ya tuberculoso dependiendo todo ello de la dosis inoculada y de la vía de introducción utilizada. Tal acción produce reacciones focales y generales, todo esto consiste en que la infección por el bacilo de Koch crea una sensibilidad frente a los productos de este bacilo, sensibilidad que es específica y que entra dentro de la alergia.

El fenómeno de Koch tiene, por consiguiente, doble carácter de hipersensibilidad y de inmuni-dad. Inyectada bajo la piel de un cobayo tuberculoso, la dosis de 0.25 ml de tuberculina lo mata en 24 ó 48 horas, el animal muere con hipotermia y presenta en la necropsia una congestión violenta, a veces hemorrágica en los focos tuberculosos - (reacción focal).

A dosis débiles no suele producir más síntomas aparentes que una elevación de la temperatura.

Las reacciones cutáneas locales, consecuti--vas al depósito de una gota de tuberculina sobre -

la piel escarificada (reacción de Von Pirquet) o a la inyección intradérmica de tuberculina muy diluida (intradermoreacción de Mantoux) se caracterizan por la formación de una pápula eritematosa, a veces acompañada de soluciones hemorrágicas y necrosis central. Estas reacciones locales no alcanzan su máxima intensidad más que después de 36 horas - aproximadamente.

La aparición de la alergia en el curso de las enfermedades infecciosas plantea el siguiente problema: ¿Cuales son las manifestaciones del cuadro clínico debidas a la alergia?

Clínicamente pueden considerarse de naturaleza alérgica ciertas fiebres y ciertas erupciones, así como anatómicamente ciertos procesos inflamatorios (inflamación perifocal de los focos tuberculosos jóvenes) y la necrosis mereciendo ésta última una mayor importancia por ser un fenómeno sumamente importante en los estados intensos de hipersensibilidad.

En la tuberculosis, la necrosis se realiza - después de la caseificación de los focos, proceso al que se puede considerar como un verdadero atributo de la infección tuberculosa y en el que se dan las circunstancias siguientes:

- a) No se produce rápidamente sino después de un cierto tiempo, que es justamente el que se tarda en aparecer la sensibilidad.
- b) Es mucho más precoz en la reinfección que en la primo infección.

- c) Todo lo que aumenta la hipersensibilidad amen
ta también la extensión de la necrosis.

Mecanismo de Acción de las Drogas Utilizadas en el Tratamiento Contra la Tuberculosis.

Estreptomina

La estreptomina es un aminoglucósido derivado de Streptomyces griseus, se encuentra disponible como clorhidrato de la base y es bastante estable, es bactericida tanto para bacterias grampositivas como gramnegativas, así como contra micobacterias.

La estreptomina se absorbe rápidamente distribuyéndose en los tejidos y líquidos del cuerpo, se excreta a través de los riñones. Difunde mal a los espacios sinoviales y al líquido cefalorraquídeo; únicamente 1/20 de la concentración extracelular alcanza el interior de las células cuando se administra por vía oral, se absorbe mal en el intestino excretándose la mayor parte de las veces.

Como otros aminoglucósidos, la estreptomina inhibe la síntesis de las proteínas. Se adhiere a la proteína de la unidad 30S del ribosoma bacteriano y causa una lectura errónea del mensaje del-RNA y por lo tanto de la síntesis de proteínas - funcionales. En las células resistentes a la estreptomina, esta proteína está alterada o más - alta.

La efectividad terapéutica está limitada por su toxicidad y por la rápida aparición de mutantes resistentes. En la tuberculosis se inyecta 1 g intramuscular, dos veces por semana (o diariamente)- se puede administrar con otras drogas como HAIN, -

PAS, que son utilizadas con estreptomocina para inhibir la aparición de mutantes resistentes.

Resistencia

Todas las cepas microbianas producen mutantes resistentes a la estreptomocina con una frecuencia relativamente alta. Una característica ya mencionada es la de que tanto las mutantes de baja, como de alta resistencia, aparecen al mismo tiempo. En la tuberculosis las combinaciones con la isoniacida u otros medicamentos, son los más comúnmente usadas; en esta forma el período útil de tratamiento con estreptomocina se prolonga en forma significativa.

- A. Alergia: Como resultado de la hipersensibilidad a la estreptomocina pueden presentarse fiebres, erupciones cutáneas y otras manifestaciones alérgicas. Esto ocurre más frecuentemente cuando el contacto con la droga es prolongado en pacientes que reciben un tratamiento largo como en tuberculosis.
- B. Toxicidad: La estreptomocina es marcadamente tóxica causando vértigo y ataxia, los cuales a menudo son irreversibles.

Acido Amino Salicilico

(Acido Para Amino Salicílico PAS)

El ácido amino salicílico y sus sales tienen propiedades antibacterianas débiles, se utiliza el PAS en el tratamiento de la tuberculosis junto con

otros agentes más potentes (estreptomina o isoniácida), para retardar la aparición de variantes resistentes. Su mecanismo de acción, está basado en la competencia con el PABA, (semejante a la acción de las sulfonamidas).

El ácido aminosalicílico se administra oralmente en una dosis promedio de 8 - 14 g. diarios. Se absorbe fácilmente, pero tiende a producir anorexia y trastornos gastrointestinales. El PAS ha sido reemplazado por otros medicamentos antituberculosos, por ejemplo, el etambutol.

Isoniacida

(Hidrácida del Acido Isonicotínico HAIN).

La isoniácida tiene poco efecto sobre la mayoría de las bacterias, pero es extraordinariamente activa contra las micobacterias, especialmente contra *M. tuberculosis*. La mayoría de los bacilos tuberculosos son inhibidos por 0.1 a 1 mg./1 ml de isoniácida in vitro, pero las poblaciones grandes de bacilo tuberculoso generalmente tienen algunos organismos isoniácidas resistentes; por esta razón la droga se emplea mejor en combinación con otros agentes antimicobacterianos (especialmente la estreptomina o el etambutol), para reducir la aparición de bacilos tuberculosos resistentes.

La isoniácida y la piridoxina son análogos estructurales. Los pacientes que reciben isoniácida, excretan piridoxina en cantidades excesivas; esto se reduce a una neuritis periférica.

La isoniacida es absorbida rápida y completamente del aparato digestivo y se excreta rápidamente por la orina, se difunde libremente en los líquidos tisulares, incluyendo el L.C.R.

Etambutol

El etambutol es un D-isómero sintético hidrosoluble.

El etambutol se absorbe bien por el aparato digestivo. Después de la ingestión de 25 mg./kg se alcanza una cifra sanguínea máxima de 2 a 5 mg/ml de 2 a 4 horas. Cerca del 20% de los medicamentos se excretan en las heces y 50% en la orina en su forma original (no hay metabolitos). La excreción se retrasa en la insuficiencia renal. Cerca del 15% del medicamento absorbido se metaboliza por oxidación. En la meningitis tuberculosa el etambutol aparece en el L.C.R. La resistencia al etambutol aparece muy rápidamente entre las micobacterias cuando el medicamento es usado sólo, por lo tanto se administra el etambutol en combinación con otros medicamentos antituberculosos principalmente con la HAIN. La hipersensibilidad al etambutol ocurre raramente.

Los efectos colaterales más comunes son los trastornos visuales, neuritis óptica y quizás daño a la retina, lo cual ocurre en algunos pacientes con dosis máximas durante varios meses. La mayoría de estos cambios mencionados, aparentemente desaparecen al discontinuar el etambutol. No obstante es imperativa la determinación de la agudeza visual durante el tratamiento.

Rifampicina

La rifampicina, es un derivado semisintético de la rifamicina, un antibiótico producido por - - Streptomyces mediterraneus. Es activo in vitro contra cocos Gram-positivos y algunos Gram-negativos, y algunas bacterias entéricas, micobacterias, - - chlamydae y virus pox. Mientras que muchos meningo cocos y micobacterias son inhibidos por menos de - 1 mg/ml, mutantes altamente resistentes ocurren en todas las poblaciones microbianas, con una frecuencia de 1 en 10⁷ o más. La administración prolongada de la rifampicina como medicamento único permite la aparición de organismos raramente resistentes. No existe resistencia cruzada con otros medicamentos antimicrobianos.

La rifampicina se liga fuertemente a la polimerasa RNA, DNA, en las bacterias. Bloquea una etapa posterior en la integración de los virus pox, quizá interfiriendo con la formación de la envoltura.

La rifampicina se absorbe bien después de su administración oral, se distribuye ampliamente en los tejidos, se excreta principalmente a través - - del hígado y en menor grado en orina.

En la tuberculosis se administra una dosis - de 450 a 900 mg. (por lo general 600 mg) diariamente junto con el etambutol u otro medicamento anti-tuberculoso con el fin de retrasar la aparición de micobacterias resistentes a la rifampicina.

La rifampicina produce un color anaranjado a

la orina y al sudor, lo cual es inocuo, los efectos colaterales ocasionales incluyen erupciones, trombocitopenia y elevación temporal de la fosfata alcalina y de la bilirrubina sérica.

Cicloserina

Antibiótico de amplio espectro y cuyo poder tuberculoestático radica en la inhibición de la síntesis de D-alanina en el mucopéptido de la pared bacteriana por un mecanismo bacteriano.

Entre la amplia lista de drogas antituberculosas merecen citarse, viomicina, novomicina, kanamicina, tiosemicarbazonas, etc., muchas de las cuales se usan indistintamente en clínicas como antibacterianos y antituberculosos.

Pruebas de Sensibilidad

Uno de los problemas más importantes hallados en el tratamiento de la tuberculosis es el de resistencia a los medicamentos. Esta resistencia se desarrolla como resultado de la multiplicación de mutantes resistentes. Cuando se administra un medicamento, la población de bacilos sensibles disminuye, permitiendo que aumenten las mutantes resistentes. Si dos o más medicamentos se administran en forma simultánea, el número de mutantes resistentes para ambos fármacos será obviamente menor que si un solo medicamento hubiera sido administrado.

Por lo tanto, es vital la evaluación de la resistencia medicamentosa denominada "prueba de --

sensibilidad" que sirve para:

1. Seleccionar los medicamentos apropiados para la quimioterapia.
2. Cambiar los medicamentos por la aparición de cepas resistentes.

Por lo anterior, es deseable que se ejecute alguna técnica confiable de sensibilidad y que la interpretación de los resultados sea de tal naturaleza que los hallazgos de un laboratorio puedan ser confirmados en otro.

Existen dos métodos principales de pruebas de sensibilidad, el método del "cociente de resistencia" y el "método de proporciones".

Método de Proporciones

Este método está basado en el principio de que aunque toda cepa de bacilo contiene algunas mutantes resistentes, una cepa resistente contendrá una mayor proporción. Por lo tanto, las cuentas viables se practican usando la cepa de los pacientes en medios que contienen el medicamento y en los que carecen de él.

Después se determina la proporción de organismos resistentes.

El método requiere la estandarización extremadamente meticulosa del medicamento respecto a su concentración en el medio de cultivo, preparaciones cuidadosas del inóculo y la cuantificación - -

exacta de las colonias. Aunque este método es eficiente como ya se mencionó, resulta dudosa su aplicación práctica en la sistematización de los análisis de laboratorio.

Método del Cociente de Resistencia

Este método está basado en la comparación bajo condiciones estándar de la cepa de prueba con la cepa estándar sensible de *M. tuberculosis* H37-RV. Concentraciones dobles del medicamento se ponen en un medio sólido (habitualmente medio de Lowenstein-Jensen). La sensibilidad o la resistencia se determina mediante el cociente de la concentración inhibitoria mínima (C.I.M.) del organismo sujeto a prueba, en relación con la C.I.M. de la cepa estándar sensible H37 RV. Se tiene la concentración inhibitoria mínima como la cantidad más pequeña de medicamento que inhibe el desarrollo de un organismo.

Método

1. Usando una asa corta de alambre nicromo número 22, de diámetro externo de 3 mm. tómese un barrido del cultivo primario y colóquese dentro de una botella que contenga cuentas de vidrio y 0.2 ml. de agua destilada estéril.

El barrido tomado con el asa del desarrollo del cultivo primario deberá tener 4 mg. de peso húmedo de bacilos. La estandarización del tamaño del inóculo es muy importante y depende de la evaluación de la cantidad de desarrollo sobre el asa que representan los 4 mg. Es aconsejable

sejable hacer la suspensión y después pesar - cierto número de barridos inicialmente; 4 mg.- podrán pronto ser evaluados con precisión razonable.

2. Usando un agitador mecánico, agítese la bote--lla durante un minuto.
3. Añádase 0.8 ml. de agua destilada estéril.
4. Usando un asa nicromo corta número 27, de 3 - mm. de diámetro externo, inocúlese la superfi--cie de la prueba de sensibilidad con una carga completa de la suspensión.

Se toman dos cultivos inclinados, un control libre de medicamentos y el otro con agar para pro--bar cada cepa.

Incubación de Pruebas

Los cultivos inclinados se incuban a 37°C - por 2 semanas.

Tomando en cuenta que existiese un desarro--llo exuberante sobre el cultivo inclinado libre - de medicamentos podrá hacerse una lectura.

Si el crecimiento es malo, los cultivos in--clinados deberán volverse a incubar. Es convenien--te no incubar los cultivos inclinados por tiempo - prolongado, ya que tiene lugar el deterioro del medicamento en el medio de cultivo a 37°C.

Clark (1967) ha demostrado que la incubación a 37°C disminuye la eficacia de la etionamida a ce

ro en menos de 4 semanas.

Lectura de Interpretación.

La CIM es tomada como la mínima concentración de medicamento que muestra menos de 20 colonias. El cociente de resistencia se obtiene dividiendo la CIM del organismo a prueba entre H37 RV. Para todos los medicamentos un cociente de resistencia de 8:1 se considera significativo de cepa resistente.

Un cociente de 2:1 demuestra que la cepa es sensible.

Incorporación de los medicamentos

Los medicamentos quedan incorporados al medio Lowenstein-Jensen antes de la inoculación en la forma siguiente:

- 1) Sulfato de estreptomina
- 2) PAS
- 3) Isoniacida (HAIN)
- 4) Viomicina
- 5) Tiosemicarbazona
- 6) Etionamida
- 7) Cicloserina
- 8) Kanamicina
- 9) Etambutol
- 10) Rifampicina

Con la capreomicina el medio de cultivo empleado es el de Middlebrooks 7H-10 ya que si el antibiótico se liga en medio de huevo, se reduce su actividad aproximadamente a la cuarta parte.

Las pruebas de sensibilidad para la piracinamida se ejecutan en un medio de pH 5.5 si se emplea medio de Lowenstein-Jensen éste se reblandece y quizás sea aconsejable el introducir el medicamento en algún medio líquido. El medio Youman es de elección. Debido a que la piracinamida es inestable en el agua todas las soluciones deberán prepararse en un amortiguador de citratos de pH 4.4

El Origen de las Muestras

Los resultados de muchas pruebas diagnósticas en las enfermedades infecciosas dependen en gran parte de la selección, el tiempo y el método que se sigue para coleccionar las muestras. Estos factores son, con frecuencia, de más importancia para las muestras microbiológicas que para aquellos métodos ideados para obtener datos químicos.

Los agentes microbianos crecen y mueren, son susceptibles a muchas sustancias químicas y pueden encontrarse en diferentes sitios anatómicos y en diferentes líquidos del cuerpo y tejidos. En general, el aislamiento de un agente infeccioso es de mucho valor para la formulación del diagnóstico. De no lograrse el aislamiento, dicho diagnóstico puede llegar a no establecerse. Por consiguiente, la muestra debe ser obtenida del sitio más adecuado para proporcionar el agente infeccioso en ese estado particular de la enfermedad y debe ser manejada de tal forma que favorezca la sobrevivencia y crecimiento del agente.

El recuperar un agente infeccioso es muy importante si el agente es aislado de un sitio que normalmente carece de microorganismos. Cualquier tipo de microorganismo cultivado a partir de sangre, líquido cefalorraquídeo líquido sinovial o de cavidad pleural es un hallazgo con significación diagnóstica. Por el contrario, muchas partes del cuerpo tienen una flora microbiana normal que puede alterarse por influencias exógenas o endógenas. La situación se complica más, frecuentemente por la presencia de mezclas de diferentes microorganismos

mos, cada uno de los cuales puede o no participar en un proceso patológico de ese tejido en particular. Se requiere entonces de una correlación bacteriológica y la experiencia médica para obtener una interpretación congruente de los resultados.

Algunas reglas generales se aplican a todas las muestras:

1. Debe obtenerse una cantidad suficiente del espécimen para permitir un estudio completo.
2. La muestra debe ser representativa del proceso infeccioso, (por ejemplo, esputo, no saliva; - pues de la lesión subyacente, no del orificio de salida; el raspado con hisopo debe hacerse de la herida, no de la superficie).
3. Debe tenerse cuidado de evitar la contaminación de la muestra empleando solamente equipo estéril y precauciones de asepsia.
4. La muestra se debe trasladar al laboratorio y examinar a la mayor brevedad.

Esputo

Generalmente se estudian las secreciones - bronquiales y pulmonares o exudados, por medio del examen de esputo. El aspecto más desorientador del examen de esputo es la casi inevitable contaminación con la flora de la boca y la saliva. Las muestras de esputo representativas deben ser espectoradas en presencia del médico desde las vías respiratorias inferiores y su aspecto exterior debe ser -

distinto al de la saliva. En caso de sospecha de tuberculosis o infección por hongos, el lavado gástrico (esputo deglutido) puede proporcionar organismos cuando el material de espectoración no lo hace.

Orina

La orina generalmente debe ser una recolección de 24 horas o como las muestras obtenidas de la micción inicial.

Líquidos de Punción

Los exudados que se obtienen de los espacios pleural, peritoneal o sinovial deben ser aspirados con la técnica aséptica más meticulosa para evitar la sobreinfección, si el material es francamente purulento se hacen frotis y cultivos directamente. Si el líquido es claro debe centrifugarse a alta velocidad por 10 minutos y emplear el sedimento para frotis y cultivos. El medio de cultivo empleado debe ser el adecuado para el desarrollo de los organismos.

Líquido Cefalorraquídeo

(L.C.R.) El diagnóstico rápido, temprano y preciso de la meningitis tiene un lugar predominante entre las emergencias médicas y depende de obtener adecuadamente los especímenes y examinar las muestras a la mayor brevedad.

Debido a que el riesgo de muerte o de daño fisular irreversible es alto a menos que el trata-

miento se inicie inmediatamente, rara vez hay una segunda oportunidad de obtener una segunda muestra pretratamiento, la cual es esencial para el diagnóstico específico y óptima atención.

Tan pronto como se sospeche de infección de SNC, se toman hemocultivos y se extrae líquido cefalorraquídeo, la punción lumbar se lleva a cabo con técnica aséptica estricta, teniendo cuidado de no provocar compresión del bulbo por extracción rápida del líquido cuando la presión intracraneana está notablemente elevada.

El líquido cefalorraquídeo usualmente se colecta en 3 ó 4 partes (2 - 5 ml. cada una) en tubos estériles. Esto permite el examen más conveniente y de más confianza para los valores que determinan la conducta a seguir.

Tratamiento de las Muestras

Todas las técnicas deberán trabajarse en un gabinete de seguridad.

Espujo

Es la muestra más comúnmente recibida para el examen en búsqueda del bacilo tuberculoso en el laboratorio y aunque el recipiente ideal es difícil de encontrar, el recipiente universal de 28 ml. con tapas con líneas de hule, constituye el más útil hasta el presente.

Estos recipientes tienen la ventaja de ser estables, fuertes y pueden soportar altas temperaturas y la centrifugación.

Si se usan cartones de plástico o de cera, el espujo deberá cambiarse a un recipiente universal para su procesamiento. Se añade una pequeña cantidad de hidróxido de sodio al cartón y con la ayuda de un hisopo de algodón podrá pasarse el espujo con facilidad.

Aunque existen muchos métodos de concentración en uso para el tratamiento de muestras y lograr el aislamiento de M. tuberculosis, los siguientes métodos han resultado ser adecuados y confiables en el manejo de grandes y pequeñas cantidades de muestras.

Antes de concentrarse el espujo, deberá anotarse la cantidad y el tipo del mismo.

Técnica de Petroff Modificada

El método de Petroff fué introducido en el año de 1915 y ha demostrado, con ciertas modificaciones, ser el más eficiente de los métodos de concentración. El método en detalle está basado en el lavado del depósito (después del tratamiento con hidróxido de sodio), con agua destilada estéril que contenga 100 ui/ml. de penicilina. El lavado con agua conteniendo penicilina ha demostrado que reduce la contaminación y además es más confiable el lavado del depósito que la técnica de neutralización con ácido.

1. Anádase un volumen igual al hidróxido de sodio al 4% en aproximadamente 4 ml. de esputo en un recipiente universal (asegúrese que el recipiente que contiene NaOH no se ponga en contacto con el cuello de la botella que tiene la muestra).
2. Agítese con la mano o de preferencia colóquese sobre una máquina agitadora y mezcladora durante 15 minutos.
3. Centrifúguese a 3,000 rpm., durante 15 minutos tomando las precauciones habituales, como la de balancear el contenido.
4. Quítese el líquido sobrenadante de la superficie del depósito y descártese en algún desinfectante, secando con papel secante cualquier escurrimiento en el exterior del cuello de la botella

5. Usando precauciones asépticas, añádanse 15 -20 ml., de agua destilada estéril sola, o bien - adicionada con 100 ui/ml. de penicilina al recipiente, póngase la tapa y agítese durante algunos minutos para volver a suspender el depósito.
6. Centrifúguese a 3,000 rpm. durante 20 minutos.
7. Vacíese el líquido sobrenadante y una vez más- séquese el borde del cuello del recipiente.
8. Inóculense con material tomado del sedimento, - toda la superficie de dos tubos con medio de - cultivo inclinado Lowenstein - Jensen, con dos asadas grandes y prepárense los frotis para el examen en forma alterna, empleando una pipeta- Pasteur, siembrese el sedimento sobre los me- dios de cultivo Lowenstein - Jensen, contenido en los tubos.
9. Incúbense los tubos en posición horizontal du- rante toda la noche a 37°C y luego por 8 sema- nas más, en posición vertical.

El desarrollo de la muestra proveniente de - un esputo muy infectado ocurrirá aproximadamente - en 2 semanas. La duración promedio que requiere el desarrollo de un buen cultivo es de 3 - 5 semanas.

Es deseable que los cultivos que son negati- vos y que están dando un frotis concentrado positivo, sean incubados por 4 semanas más o mayor tiem- po, ya que a menudo ocurre el desarrollo después - de 8 semanas.

El hidróxido de sodio deberá usarse a la menor concentración posible ya que es tóxica para el bacilo tuberculoso si está muy concentrado. El porcentaje de NaOH deberá decidirse por los resultados obtenidos en algunos laboratorios, se encuentra el 2% como una concentración muy adecuada en tanto que en otros se usa el 4%.

Esta variación está propensa a ocurrir por cambios de temperatura y aumento de microorganismos contaminantes.

Método del Fosfato Trisódico (Corper y Stoner, - -

1. Aproximadamente 4 ml. de esputo en un recipiente universal, se agrega un volumen igual de fosfato trisódico al 10% y se agita para mezclar.
2. Incubar a 37°C en una incubadora seca durante 30 minutos.
3. Centrifugar a 3,000 rpm. durante 30 minutos.
4. Suspender de nuevo el sedimento en agua destilada (aproximadamente 15 - 20 ml).
5. Centrifugar a 3,000 rpm. durante 30 minutos.
6. Inoculando 2 tubos con medio de Lowenstein - - Jensen y preparando los frotis.

Almacenamiento de los Cultivos

Los cultivos en Lowenstein - Jensen, deberán conservarse por un período adecuado (habitualmente 6 meses) después de haber terminado las prue



bas de sensibilidad y de identificación por si hubiera necesidad de practicar investigaciones posteriores. El método más satisfactorio de almacenamiento es el de colocar los cultivos en bandejas de aluminio en la parte profunda de un congelador a 2°C. A esta temperatura, la viabilidad se mantiene hasta por 2 años. Para practicar subcultivos, el cultivo se quita de la congelación y se deshela a la temperatura del laboratorio antes de transferir el desarrollo a un medio fresco.

Muestras de Orina

Las muestras de orina son recibidas como la reunión de la orina de 24 horas o como las muestras obtenidas de la micción inicial matutina.

1. La muestra de orina debe tomarse en frasco estéril con tapón de rosca.
2. Utilizar una cantidad de orina de 70 ml. aproximadamente.
3. Agregar a la muestra de orina 1 ó 2 gotas de albumina bovina en solución al 30% (Michael Research Foundation Chicago Ill. USA).
4. Agregar de 0.5 a 1.0 ml de ácido sulfosalicílico al 25% para producir precipitación de proteínas con lo que se arrastrarán los bacilos presentes.
5. Con movimientos rotatorios homogenizar perfectamente la muestra.
6. Dejar la muestra en refrigeración por espacio de 24 horas para completar la precipitación.

7. Tomar 7 a 10 ml. del sedimento y verterlo en un tubo estéril de 13 x 100 mm.
8. Centrifugar a 3,000 rpm. durante 20 minutos.
9. Desechar el sobrenadante.
10. Homogenizar el sedimento y agregar solución - reguladora de fosfatos con pH de 7.2 y 7.8.
11. Repetir los incisos 7 y 8 una vez más.
12. Desechar el sobrenadante y tomar con pipeta - Pasteur el sedimento para hacer frotis.
13. Hacer tinción para bacilo alcohol ácido resis - tente y observar al microscopio.
14. Si se trabajó en condiciones de esterilidad - puede utilizarse el sedimento para siembra.

Contenido Gastrico

Se recomienda que el contenido aspirado sea reunido en una botella estéril de 28 ml. que contenga 5 ml de fosfato trisódico al 10%, esto elimi - na la posibilidad de que el ácido clorhídrico destruya a los bacilos tuberculosos existentes en la muestra.

Tan pronto como se reciba la muestra en el - laboratorio deberá centrifugarse y el sedimento - tratarse por el método usado para el esputo.

Líquido Pleural

Los derrames pleurales deberán reunirse en - solución estéril de citrato sódico al 3.8% para -

prevenir la formación del coágulo.

1. Centrifúguese la muestra para preparar películas del sedimento, tiñéndolas por el método de Gram.
2. Si no se observan organismos secundarios en las películas teñidas con Gram, se debe hacer una inoculación directa sobre medio de Lowenstein - Jensen, sin embargo, ésta deberá acompañarse por el mismo medio inoculado con una muestra tratada. Las muestras no tratadas pueden contener sólo algunos bacilos y éstos podrían ser destruidos por el tratamiento con NaOH, no obstante, si están presentes otros organismos deberá usarse el tratamiento con NaOH.

Pus

Las muestras de pus deberán ser tratadas de la misma manera que los líquidos pleurales.

Líquido Cefalorraquídeo

Después de la reunión de una muestra de LCR de algún paciente con meningitis tuberculosa, puede producirse un coágulo en "red de araña", si éste es hallado, se empleará una porción del mismo para preparar las laminillas y teñirlas con técnicas para bacilo alcohol ácido resistente ya que a menudo estos organismos se encuentran atrapados en la estructura del coágulo.

Ya que es poco probable que el LCR contenga más de un organismo infectante, el depósito podrá-

inocularse por lo general sobre medio Lowenstein - Jensen; no obstante, si se observan otros organismos, el tratamiento será como para líquido pleural.

Los bacilos tuberculosos en las laminillas preparadas de LCR son a menudo muy escasos y deberá prepararse el laboratorio a una extensa búsqueda en numerosas preparaciones.

Heces

Preparación de laminillas:

1. Prepárese una emulsión espesa de heces en solución salina.
2. Añádese igual volumen de éter y agítese bien.
3. Centrifúguese a 3,000 rpm. durante 5 minutos.
4. Con cuidado quítese el éter y prepárense 3 laminillas tomando el material de la capa intermedia situada en la interfase del éter y la solución salina.
5. Tiñase con técnica de bacilos acidorresistentes.

CULTIVO.- Preparese una emulsión de la muestra en solución salina y añádase 4 veces su volumen de NaOH al 4% tratándose como para el esputo.

Precauciones de Seguridad

Debido a la introducción de un gran número de medicamentos antituberculosos y del descubrimiento de muchas micobacterias responsables de la-

enfermedad, el papel del laboratorio que se encarga de manejar el material tuberculoso o sospechoso es de suma importancia. Quizá uno de los peligros más grandes del procesamiento de muestras de tuberculosis, consista en la familiaridad que se adquiere con el trabajo, con el consecuente relajamiento de las precauciones y las técnicas de seguridad.

Formación de Aerosoles

Las muestras, cultivos y aparatos, constituyen todos ellos, fuentes potenciales de infección y uno de los riesgos más importantes es la formación de gotas contaminadas o aerosoles.

Los aerosoles se forman por la ruptura de alguna superficie líquida. Las gotas de mayor tamaño y peso caen, mientras que las más pequeñas permanecen suspendidas en el aire. El líquido puede evaporarse a partir de estos aerosoles dejando bacterias que son fácilmente inhaladas hasta el interior de los pulmones.

Hasta la abertura de botellas con tapones de rosca que contienen cultivos sobre medios sólidos puede crear aerosoles, como lo puede crear la centrifugación de botellas herméticamente selladas o cerradas con tapa de rosca.

Para eliminar hasta donde sea posible el riesgo de infección a partir de estos aerosoles, deberán tomarse ciertas precauciones para la manipulación de material infectado, se usaron gorros semejantes a los empleados en los quirófanos, que no deben ser usados fuera del laboratorio y debe--

rán ser esterilizados en autoclave, conforme sean usados; se utilizarán además cubrebocas dobles y guantes de hule desechables.

Las reglas habituales de sentido común como la de no fumar ni comer en el laboratorio deberán ser cumplidas en forma rigurosa.

Gabinetes de Seguridad

El diseño de un gabinete de seguridad deberá ser tal que el aire sea dirigido a través del gabinete hasta un embudo de salida mediante un ventilador extractor.

Deberá estar situado en un punto cercano al lugar donde sea descargado el aire.

Si no se usa sistema de filtración, la salida deberá conducir a una tubería de desagüe o embudo que se abra a la atmósfera exterior cuando menos a una altura de 1.80 metros por arriba del nivel del techo.

Cuando se usan estos gabinetes, las partículas infectadas son llevadas lejos del operador hasta la atmósfera exterior, donde de inmediato son diluidas y destruidas por los rayos ultravioleta del sol. Algunos gabinetes están dotados de un filtro situado entre el gabinete y la salida y éste elimina algo de las partículas infectantes antes de que sean lanzadas al aire. Por supuesto que el filtro deberá ser esterilizado antes de removerlo y de insertar uno nuevo. Este, por lo general, es sumergido en vapores de formalina.

Muchos gabinetes tienen un tubo de luz ultravioleta insertado en el techo, como medio para esterilizar el gabinete. No hay medio efectivo de esterilización, ya que los experimentos han demostrado que aún cuatro horas después de la exposición a la contaminación, los bacilos dentro del material-patógeno pueden permanecer viables todavía.

La desinfección química es mucho más deseable, y los gabinetes deberán ser lavados con desinfectantes todos los días, inclusive si se ha empleado luz ultravioleta.

Centrifugas

Las centrifugas y las máquinas agitadoras deben ser alojadas de preferencia en un gabinete de seguridad. El ventilador o extractor es puesto a funcionar durante todo el ciclo de trabajo de la centrifuga y cuando se termina se dejará 5 minutos, antes de que se abra y se quiten los tubos. Los aerosoles formados durante la centrifugación son extraídos antes de que el operador se incline sobre la centrifuga, a sacar los tubos.

El balanceo de los tubos deberá practicarse usando alcohol al 70% en lugar de agua (ya que ésta puede contaminarse con facilidad); el interior de la centrifuga deberá ser lavado con un desinfectante adecuado al terminar todos los días.

Eliminación del Material Desinfectado

Todo el material empleado en el laboratorio deberá ser esterilizado mediante autoclave.

Las pipetas deberán ser colocadas en jarras que contengan algún desinfectante adecuado y luego serán esterilizadas antes de limpiarlas y volverlas a esterilizar.

Los cultivos serán colocados en jarras que contengan algún desinfectante adecuado, haciendo lo mismo con los frascos para esputo y los recipientes de cartón encerados.

Examen Bacterioscópico

Tinción de Mycobacteria:

Acidorresistencia.- Es la propiedad del bacilo que se ha atribuido a varias causas:

1. A la constitución química en la que interviene un derivado lípido, el ácido micólico que, aislado y teñido independientemente es acidorre--sistente aunque más pálido que el propio bacilo.
2. La integridad física de los cuerpos bacteria--nos ya que pierden su acidorresistencia al ser triturados.

En realidad no hay versión única y concluyen--te al respecto.

Tinción de Ziehl - Neelsen

Laminillas:

Se requieren las siguientes soluciones:

Fucsina fenicada (carbó - fucsina, fucsina carbó--lica, etc.).

Fucsina básica 1 gr.

Alcohol absoluto 10 ml.

Fenol al 5% en agua destilada 100 ml.

Disuélvase la fucsina básica en alcohol y -

luego combínesese con la solución fenicada.

Alcohol ácido.

HCl (densidad 1.19) 3 ml.

Alcohol absoluto al 95% (Alcohol industrial-metilado) 97 ml.

Azul de metileno.

Azul de metileno 0.5 gr.

Agua destilada 100 ml.

Método:

1. Fijar la laminilla con calor.
2. Impregnar la laminilla con fucsina fenicada, calentando en una platina a emisión de vapor - 5 min.
3. Lavar con agua corriente de la llave.
4. Lavar con el alcohol ácido.
5. Lavar con agua corriente de la llave.
6. Contrateñir con azul de metileno al 0.5% o con verde de malaquita durante 30 segundos.
7. Lavar con agua corriente de la llave.
8. Dejar secar y observar con objetivo de inmersión.

RESULTADO: Bacilos acidorresistentes, muestran color rojo, los núcleos celulares tienen color azul o verde.

CORTES:

Se requieren las soluciones siguientes:

Fucsina fenicada.

Alcohol ácido al 3%

Azul de metileno o verde de malaquita al - -
0.2%.

Método

1. Quitar la parafina con xilol, alcohol y agua.
2. Enjuagar la laminilla con fucsina fenicada, y teñir con calentamiento durante 10 ó 15 minutos.
3. Lavar en agua corriente de la llave.
4. Lavar con alcohol ácido al 3% hasta que los ba cilos retengan la tinción al examinar al microscopio.
5. Lavar con agua corriente de la llave.
6. Contrateñir con azul de metileno al 0.2% o con verde de malaquita durante 2 minutos.
7. Lavar con agua corriente de la llave.
8. Deshidratar con rapidez, limpiar y montar en balsamo neutro.

Resultados: Bacilos ácido resistentes, mostrarán color rojo.

Núcleos celulares color azul.

Eritrocitos color rosa.

Tinción Fluorescente con Auramina-Fenol.

Laminillas, se requerirán las soluciones siguientes:

Auramina-fenol.

Fenol acuoso al 3% 100 ml.

Calentar aproximadamente 30 grados centígrados y añadir auramina 0.3 g, agítar bien y filtrar.

KMnO₄ al 1%

Mezcla alcohol ácido al 3%.

Método

1. Teñir la laminilla fijada con calor, usando auramina-fenol durante 10 minutos.
2. Lavar con agua.
3. Decolorar con alcohol-ácido al 3% durante 5 - min.
4. Lavar con agua.
5. Contrateñir con KMnO₄, al 1% durante 30 seg.
6. Lavar y dejar secar al aire.
7. Examinar con microscopio de fluorescencia.

Resultado: Los bacilos ácido resistentes aparecen como bastones luminosos contra un fondo obscuro.

Tinción Fluorescente con Auramina-Rodamina

Se requerirán las soluciones siguientes:

Auramina O	1.5 g.
Rodamina	0.75 g.
Glicerol	75 ml.
Cristales de fenol (licuados)	10.0 ml.
Agua destilada	50.0 ml.

Mezclar el agua y el glicerol, añadase el fe no l y agítese meticulosamente. Verifique que la so lu ci ó n este transparente, antes de disolver en é l l a la rodamina. Finalmente añada la auramina, y agítese exhaustivamente, hasta que se haya disuelto. Cuando este preparandose la tinción en canti--dad masiva, es conveniente dejar la mezcla a 37 - grados para asegurarse que toda la auramina esta - en solución. Esta solución permanece estable durante va ri os me se s, a la temperatura del cuarto. Es - aconsejable filtrar antes de usarse.

Método para las laminillas:

1. Teñir laminillas fijadas con calor, durante 10 minutos, hasta emisión de vapor.
2. Quitar el color, usando alcohol ácido al 3%.
3. Enjuagar cuidadosamente en agua corriente de - la llave.
4. Contrateñir con KMnO_4 al 1%, de 2 a 5 minutos.
5. Lavar, secar y examinar con microscopio de - -

fluorescencia.

Método para los cortes:

1. Quitar la parafina, con xilol, alcohol y agua.
2. Teñir con tinción de auramina-rodamina por 10-min. Calentando a temperaturas superiores a los 60°C.
3. Lavar con agua.
4. Decolorar con alcohol ácido al 3%.
5. Lavar con agua de la llave.
6. Contrateñir con KMnO_4 al 1%, durante dos minutos.
7. Lavar con agua y dejar secar.
8. Sumérjase en xilol y móntese en balsamo neutro.
9. Examinar con microscopio de fluorescencia.

Resultado:

Los bacilos ácido resistentes aparecen, - como bacilos de color rojo dorado sobre fondo obscuro.

Cultivo

Para ayudar a la identificación de los bacilos observados y conocer su viabilidad procedemos en segundo término a efectuar el cultivo.

MEDIOS.- El medio recomendado para el trabajo sistemático es el de Lowenstein - Jensen. El me dio es simple de preparar y puede ser usado para el cultivo primario, identificación y pruebas de sensibilidad de Mycobacteria.

El medio modificado descrito por Jensen - (1932), contiene almidón de papa pero éste ha sido omitido en publicaciones más recientes por Jensen (1955). Aunque el medio más reciente ha sido hallado satisfactorio en muchos laboratorios, se ha sugerido que la inclusión de almidón proporciona un crecimiento más exuberante. Diversas substancias pueden agregarse al medio de Lowenstein - Jensen, como el piruvato sódico, para el estímulo de cepas bovinas, ácido paranitrobenzoico para distinguir M. tuberculosis y M. bovis, de las micobacterias atípicas y los agentes antimicrobianos usados en las pruebas de sensibilidad. El medio de Lowenstein - Jensen, tiene un pH aproximado de 7.0, lo cual resulta satisfactorio para la mayoría de las investigaciones.

Medio Lowenstein - Jensen

Solución de Sales Minerales:

K H ₂ P ₀ 4	4.0 g.
Mg S ₀ 4	0.4 g.

Citrato de Magnesio	1.0 g
Asparagina	6.0 g
Glicerol	20.0 ml
Agua destilada	1000.0 ml

Disuélvase mediante calentamiento, distribúyanse en volúmenes de 300 ml., y esterilícese en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Solución de verde de malaquita

Verde de malaquita	2.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Disuélvase por calentamiento, fíltrese y esterilíce en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio Completo:

Solución de sales minerales	300 ml
Solución de verde malaquita	10 ml
10 huevos batidos	

Método de preparación:

1. Limpiar el cascarón de 10 huevos grandes (aproximadamente 500 g) en alcohol metílico, romper los huevos dentro de un frasco cónico estéril que contiene cuentas de vidrio.
2. Agitar el frasco y añadir 300 ml de solución de aceite mineral.

3. Añadir 10 ml de solución de verde de malaquita.
4. Agitar bien y filtrar a través de muselina esteril.
5. Distribuir en condiciones asepticas en recipientes universales.
6. Llevar los recipientes universales con la inclinación adecuada a un coagulador a 75 u 80 grados centígrados durante 6 horas por tres veces consecutivas, con intervalos de 24 horas.

Si se incluye el almidón en el medio, puede añadirse a la solución de sales minerales (12 g en 300 ml), calentándolo sobre la flama hasta que se obtenga una mezcla lisa.

Medio con piruvato.- Una concentración de 0.5% de piruvato es puesta en medio de Lowenstein-Jensen antes de la solidificación del medio.

En presencia de piruvato las cepas bovinas adquieren la capacidad de utilizar el glicerol y la glucosa para producir tipos eugónicos de desarrollo.

Medio P. N. B.- La adición del ácido para-nitrobenzoico (sal sódica) al medio Lowenstein-Jensen a la concentración final de 500 g/ml fué introducida por Tsukamura y Tsukamura (1964) para ayudar a las cepas bovina y humanas a diferenciarlas de las micobacterias atípicas.

Medio de Youmans (modificado por Proskaver y Beck).

Asparagina	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
K ₂ SO ₄	0.05 g
Glicerol	2.0 ml
Agua destilada	100.0 ml

Disolver los ingredientes en el agua en el orden descrito, asegurándose que cada uno se disuelva por completo antes de añadir el siguiente.

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH al 40% y añadir citrato de magnesio 0.15 g.

Esterilizar a 121°C durante 20 minutos.

Cuando se enfríe añadir suero humano, bovino o de caballo o plasma para proporcionar una concentración final de 10%.

Medio Kirschne modificado:

KH ₂ PO ₄	2.0 g
NaHPO ₄ .12 H ₂ O	19.0 g
MgSO ₄	0.6 g
Citrato Sódico	2.5 g
Asparagina	5.0 g
Glicerol	20.0 ml
Agua destilada	1000.0 ml
Rojo de fenol 0.4%	3.0 ml

El ácido pirúvico deberá neutralizarse con - NaOH.

Esterilizar el medio alcalino a 115°C. Cuando se haya enfriado añadir 5 ml de albúmina bovina. Filtrar por Seitz y adicionar 10 ml de plasma humana citratado el pH es de 7.4 - 7.6.

Medio Líquido Middlebrook 7H-9.

Sulfato de amonio	0.5 g
L-glutamato sódico	0.5 g
Citrato sódico	0.5 g
Clorhidrato de piridoxina	0.001 g
Biotina	0.0005 g
Na ₂ P04	2.5 g
KH ₂ P04	1.0 g
Citrato de hierro amoniacal	0.04 g
MgS04.7H20	0.05 g
ZnS04.7H20	0.001 g
CaCl2. 2H20	0.0005 g
CUS04. 5H20	0.001 g
Tween 80	0.5 ml
Agua destilada	1000.0 ml

Disolver en el agua, embotellar en volúmenes de 95 ml y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, para su uso añadir 5 ml de solución de dextrosa - albúmina bovina y 0.3 ml de solución

de catalasa.

Middlebrook 7H-10 agar

Sulfato de amonio	0.5 g
1 ácido glutámico	0.5 g
citrato sódico	0.4 g
$\text{Na}_2\text{HP04}$	1.5 g
KH2P04	1.5 g
Glicerol	5.0 ml
Citrato amoniacal férrico	0.04 g
MgS04.7H20	0.05 g
CaCl2.2H20	0.0005 g
ZnS04.7H20	0.001 g
CuS04.5H20	0.001 g
Clorhidrato de piridoxina	0.001 g
Biotina	0.0005 g
Verde de malaquita	0.001 g
Polvo de agar	15.0 g

Las oligosustancias son convenientemente preparadas como solución patrón; primero disolver las sustancias químicas, añadir y disolver en caliente el polvo de agar, distribuir en volúmenes de 90 ml, esterilizar a 121°C durante 15 minutos.- Para usar el agar se funde y se enfría a 50°C antes de añadir 10 ml de complejo dextrosa albuminica-ácido oléico y 0.3 ml de solución de catalasa.

Complejo dextrosa - albúmina bovina.

Acido oléico	0.5 g
Fracción V de albúmina bovina	50.0 g
Dextrosa	20 g
NaCl	8.5 g
Agua destilada	1000.0 ml

Preparación: Disolver la dextrosa y la albúmina bovina en solución salina. Añádase ácido oleico en NaOH 2N y después mézclense ambas soluciones. Filtrar a través de un filtro Seitz y almacenar a 4°C.

Solución de dextrosa - albúmina bovina.

Fracción V de albúmina bovina	50 g
Dextrosa	20 g
Agua destilada	1000.0 ml

Disolver en el agua, filtrar a través de un filtro Seitz, embotellar y almacenar a 4°C.

Solución de catalasa:

Catalasa cruda (hígado de ternera)	1.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

Disuélvase en agua y filtrese a través de un filtro de membrana, embotellar y almacenar a 4°C.

Pruebas Bioquímicas

Prueba de Reducción de Nitratos

La reducción de nitratos y nitritos es de valor para distinguir entre las cepas humanas y bovinas de *M tuberculosis*.

Las cepas humanas son, por lo general, intensamente positivas y las cepas bovinas son débilmente positivas o negativas.

Reactivos:

1. Amortiguador de fosfato a pH7.0
2. Nitrato sódico 0.02 M en amortiguador de fosfatos.
3. HCl diluido 1:1.
4. Sulfanilamida al 0.2% en agua destilada.
5. Clorhidrato de N. (1-Naftil) etilendiamina al-0.1% en agua destilada.

Método

1. Suspender aproximadamente 10 mg. (peso húmedo) de bacilos en 1 ml., de amortiguador de fosfatos y agregar 1 ml., de solución de nitrato sódico, mézclese bien.
2. Incubar a 37°C durante 24 horas.
3. Añadir 1 gota de solución de HCl.
4. Agregar 2 gotas de solución de sulfanilamida.

5. Añadir 2 gotas de solución de 1-naftilo.
6. Mezclar y observar el color después de 5 minutos; la prueba con resultado negativo resulta incolora, si resulta positiva; adquiere un color rojo - violeta intenso.

Pigmentación:

No constituye una característica confiable, aunque es útil si las condiciones se estandarizan. Si se está inoculando algún cultivo para alguna prueba de pigmentación, es aconsejable el perforar la tapa del recipiente con una aguja estéril hipodérmica, la cual tiene un tapón de algodón en el extremo final del auditivo de la jeringa, esto permite abastecer el aire al cultivo en desarrollo y la aparición de la pigmentación con este método mejora notoriamente en algunas cepas.

Los colores producidos pueden variar desde el tono ante de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, hasta el amarillo y naranja profundo de las *M. atípicas*.

Se deberán probar dos cultivos idénticos para la pigmentación uno en la obscuridad y otro expuesto a la luz durante todo el período del crecimiento.

Desarrollo a 25°C

Inocúlese un medio inclinado de Lowenstein-Jensen, usando el inóculo estandar de 4 mg como ya se describió. Incúbese a 25°C durante 4 semanas y examínese buscando el crecimiento. Ciertas espe-

cies atípicas se desarrollan a 25°C, pero no sucede así con *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

El tamaño del inóculo y la longitud de la incubación son importantes ya que un incremento de ambos puede producir el desarrollo de las cepas humanas y bovinas.

Prueba de Hidrolisis del Tween

Para la diferenciación de *M. terrae*, *M. gastris* y el grupo aviario Battey). (Método de Wayne, - Dounek y Cussell, 1964).

MEDIO: Amortiguador de fosfatos a pH de 7.0, conteniendo 0.5% de Tween 80 y 20 microgramos/ml - de rojo neutro. Distribuir en cantidades de 2.5 ml en botellas de tapa de rosca y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

INOCULO: 0.2 mg/ml de peso húmedo en bacilos tomados de un cultivo de Lowenstein-Jensen de 7 semanas de crecimiento.

INCUBACION: A 37°C examinado todos los días - buscando un color del ámbar al rosa. Las lecturas - importantes se practican a los 5 y 10 días.

Prueba de opacidad del Tween (Wayne, Dobek y Cussell (1964).

MEDIO:

Al agar fundido Middlebrook 7H-101 anádase - 0.002% de Tween 80 para ser usado como control y -

2.5% para la prueba, póngase en una probeta estéril y colóquese en posición vertical.

INOCULO.- Se inocular una gota de una pipeta-Pasteur de los 4 mg/ml de la suspensión estándar - (empléese como para pruebas de sensibilidad) sobre la superficie del agar. Incúbese a 37°C hasta por 6 semanas.

RESULTADOS:

Los cultivos se desarrollan sólo sobre la superficie del agar y si la opacidad está presente se extiende hacia abajo del agar a medida que progresa la incubación.

Prueba de Tolerancia al Oleato (Wayne, Doubek y - Rusell 1964).

En esta prueba es de valor la diferenciación de los organismos agrupados como bacilos aviarios. - Battey M. gastri, proporciona un resultado negativo mientras que M. avium - bacilos Battey y M. terrae dan resultados positivos.

Medio:

Agar Middlebrook 7H-10 con albúmina y dextrosa.

Medio de control.- Añádese 0.005% de ácido oleico.

Medio de prueba.- Añádese 0.025% de ácido oleico.

Sírvase como cultivos inclinados de agar en recipientes universales.

INOCULO.- Es satisfactorio el inóculo de la prueba estándar de sensibilidad.

INCUBACION.- A 37°C, hasta por 6 semanas.

LECTURA.- Un desarrollo confluyente (ignorando las escasas colonias), se considera como positivo.

CEPA	CATALASA	HIDR. DEL TWEEN	CP. DEL TWEEN	TOLERAN. AL OLEATO
<u>M. terrae</u>	Elev. Activ.	+	+	+
<u>M. gastri</u>	Baja Activ.	+	-	-
Grupo aviarío Battey	Baja Activ.	-	+	+

Pruebas Enzimáticas

Bonicke y Lisboa (1959) describieron las pruebas de amidasa, que posteriormente fueron usadas para diferenciar micobacterias por el patrón de resultados obtenidos.

Hay numerosas amidas que han sido empleadas por diversos investigadores, Bonicke, recomendó 10 y Juhlin (1967) estudió otras 13; no obstante empleando 5 sustratos puede hallarse un patrón útil.

Soluciones de amida patrón.

Acetamida 9.67 mg. disueltos en 10 ml de agua a 60°C

Benzamida	19.83 mg.	disueltos en 10 ml de - - agua a 60°C
Nicotinamida	19.99 mg.	disueltos en 10 ml de - - agua a 60°C
Piracimida	20.16 mg.	disueltos en 10 ml de - - agua a 60°C
Corbamida (Urea)	9.83 mg.	disueltos en 10 ml de - - agua en 60°C

Soluciones de trabajo. Disuélvanse las soluciones patrón con agua destilada para que dé una solución final de 0.00164 molar.

Solución de sulfato de magnesio.

Prepárese una solución 0.003M, de sulfato de magnesio ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) disolviendo 66.9 mg. en 100-ml de agua. Almacénese durante varios meses.

Solución de fenol.

Añádanse 12.5 g. de fenol a 5 ml de agua destilada, agítese vigorosamente y agréguese 27 ml de NaOH 5N. Agítese hasta que todo el fenol se haya disuelto, complétese hasta 50 ml de agua destilada.

(Prepárese solución fresca todos los días).

Solución de hipoclorito.- A 300 ml de agua destilada a 90°C añádase 25 g de hipoclorito cálcico, agítese y agréguese durante agitación subsiguiente 135 ml. de solución de carbonato potásico-

al 20% (K_2CO_3).

Hiérvase durante algunos minutos para eliminar el amoníaco, cuando se haya enfriado, analícese buscando iones de calcio mediante la adición de un poco de solución de carbonato potásico, si hay iones calcio, la solución se pondrá lechosa, entonces será necesario añadir más K_2CO_3 hasta que permanezca clara. Finalmente, hiérvase la solución por algunos minutos, enfriése e intégrese un volumen de 500 ml con agua destilada.

Amortiguador de fosfatos 15 M (pH 7.2)

27.4 ml de KH_2PO_4 (9.078 g en 1 litro de agua destilada)

72.6 ml de $Naz HPO_4$ (H.876 en 1 litro de agua destilada).

Añádanse las dos soluciones juntas y esterilícese en autoclave a $121^\circ C$ durante 10 minutos.

Suspensión bacilar:

Se mezcla el desarrollo de varios cultivos - Lowenstein-Jensen inclinados en una botella de vidrio, se vuelve a pesar la botella. Añádase amortiguador de fosfatos para dar una concentración final de 10 mg/ml de bacilos húmedos. Agítese la botella para poder producir una suspensión.

1. Colóquense por duplicado 5 probetas para la prueba (una para cada sustrato), un control para la suspensión bacilar sin sustratos y otra

para el sustrato sin bacilos.

2. A cada ml de sustrato añádase 1 ml de suspensión de bacilos y mezclese bien.
3. Incúbense las probetas de un conjunto a 37°C - durante 4 horas, el otro conjunto de incubado - durante 24 horas.
4. Después de la incubación añada a cada probeta 0.1 ml de sulfato de manganeso en solución, - 1.0 ml de solución fenicada y 0.5 ml de solución de hipoclorito, colóquense las probetas en agua hirviente durante 20 minutos.
5. Lectura.- Un resultado positivo muestra un color azul que indicará la presencia de amoníaco. La intensidad del color será proporcional a la cantidad de amoníaco que está presente, y - - Juhlin (1967) describe una serie de soluciones de referencia que pueden ser usadas para comparación colorimétrica.

Reacción de la Catalasa - Peroxidasa

Constituye una prueba valiosa de escrutinio para Mycobacteria, las cepas humanas muestran actividad de catalasa solo las que son sensibles a la HAIN así como las Mycobacteria atípicas mostrando la mayor parte una efervescencia más intensa. Deberá notarse que las cepas humanas pierden su actividad catalasa y peroxidasa cuando se vuelven resistentes a la HAIN, lo cual puede ayudar como método para distinguir las de las cepas atípicas que retienen su actividad de catalasa, inclusive frente a -

las más altas concentraciones de HAIN.

Reactivos

1. Peróxido de hidrógeno a 30 volúmenes.
2. Catecol al 2% en agua destilada (Esta sustancia es dañina si es absorbida por la piel, - - siendo además corrosiva debiendo manejarse con precaución.

Método:

1. Mézclense volúmenes iguales de las 2 soluciones y añádanse 5.0 ml al cultivo de prueba y - también a un control positivo y a uno negativo.
2. Déjese reposar algunos minutos observando cualquier efervescencia producida por las cepas positivas a la catalasa. La aparición de un color pardo en las colonias indica actividad de la peroxidasa. Prepárese una solución fresca - para cada grupo de pruebas.

Interpretación de los Resultados

1. Positivo a la catalasa, positivo a la peroxidasa = M. tuberculosis, sensible a la HAIN.
2. Negativo a la catalasa, negativo a la peroxidasa = M. tuberculosis, resistente a la HAIN.
3. Positivo a la catalasa, negativo a la peroxidasa = M. atípica.

Prueba de la Arilsulfatasa

Las Mycobacteria atípicas muestran actividad de arilsulfatasa, pero no en las cepas humanas ni en bovinas.

Hay dos métodos que se han hallado satisfactorios para el uso general, uno que emplea un medio líquido y el otro que utiliza el medio sólido de Dubois. Usando la prueba con el método sólido - ha resultado posible reconocer a *M. fortuitum* en 3 días.

Método 1

Medio basal. Middlebrook 7H-(, medio líquido con adición de albúmina de bovino, glucosa y catalasa.

Disulfato potásico de fenolftaleína. Pésense 0.646 g y disuélvanse en 100 ml de agua destilada para que se obtenga una solución 0.01 M. Esterilícese por filtración de membrana y añádanse 10 ml.- a cada 100 ml del medio 7H-9 para dar una concentración final de 0.001 M, distribuyánse en volúmenes de 5 ml.

Prueba

Inocúlese a 5 ml. del medio ya descrito con 0.1 ml. de cultivo líquido del organismo de prueba e incúbese durante 14 días a 37°C.

Pruébese buscándose la actividad de la arilsulfatasa, añadiendo NaOH 2N gota a gota al culti-

vo, la aparición de un color rosa señala una reacción positiva, habiéndose liberado la fenolftaleína. Es importante que se añada NaOH con cuidado ya que la fenolftaleína cambia de color.

Método 2 (Wayne, 1961).

MEDIO.- A 100 ml. de agar 7H-10 Middlebrook, añádanse 65 mg., de sulfato tripotásico de fenolftaleína, después de mezclar, distribúyase el agar en botellas con volúmenes de 7 ml y esterilícese - en autoclave a 121°C durante 15 minutos, permitiendo que se solidifiquen en la posición vertical.

METODO.- Inocúlese la superficie del medio - con una porción de colonia e incúbese a 37°C durante 3 días. Añádase 0.5 ml de solución de carbonato 1.0 M al cultivo y obsérvese la aparición de un color rosa que indica el resultado positivo.

Pruebas In Vivo. Inoculación en Animales de Experimentación

Todas las inoculaciones en animales de experimentación deberán hacerse en gabinetes de seguridad. Los animales serán guardados en jaulas completamente cerradas. Después de su uso deberán ser esterilizadas en autoclave con canaletes alimentarios, botellas con agua, etc.

La necropsia de los animales se practicará en un gabinete de seguridad, primero se lavará al animal en alguna solución desinfectante para humedecer la piel.

Después de la necropsia el animal es colocado en una bolsa de plástico e incinerado. Los instrumentos deberán ser esterilizados en autoclave y se desinfectará el gabinete de seguridad.

No se entrará al lugar donde habitan los animales de experimentación sin cambiarse primero, poniéndose botas de hule y gorro. Antes de salir, se desechará el gorro para que sea esterilizado y se lavarán las botas con desinfectante.

Cobayos

Se prepara un inóculo estandar del crecimiento de 2 - 3 semanas de un cultivo antiguo Lowens--tein - Jensen como sigue:

1. Pésese una botella estéril de 7 ml que contenga 12 cuentas de vidrio de 3 mm. de diámetro.

2. Añádase un barrido completo de cultivo con asa a la botella seca y pésele de nuevo.
3. Calcúlese el peso húmedo de los bacilos y añádase agua (o albúmina bovina al 0.1%) para que se obtenga una suspensión final de 2 mg/ml. - Agítese la botella durante 1 minuto para producir una suspensión uniforme.
4. Inyéctese al animal en el músculo del muslo - con 0.5 ml de la suspensión preparada.
5. Se mata a los animales después de 6 semanas y se les examina buscando enfermedad en el sitio de inoculación, y en los ganglios infectados, - hígado, bazo y pulmones.

Conejo:

Se preparará una suspensión estándar de 10 - 14 días de cultivo en medio Middlebrook 7H-9 líquido con albúmina y tween.

1. Un cultivo completamente desarrollado de albúmina - tween contiene aproximadamente 0.6 mg. - de bacilos por peso húmedo. Dilúyase este cultivo hasta una concentración final de 0.002 - mg/ml.
2. Inyéctese al animal por vía endovenosa con 0.5 ml del cultivo diluido.
3. Mátese al conejo después de 6 semanas y examínese buscando signos de la enfermedad, en el - bazo, hígado, pulmones o riñones.

Raton:

Método 1.- Se prepara una suspensión estándar que contenga 1.0 mg/ml de bacilos por peso húmedo. Inyéctese al ratón en la vena de la cola con 0.2 ml (0.2 mg) usando una jeringa de tuberculina de 1.0 ml con una aguja del número 26.

Método 2.- Inyéctese por vía intraperitoneal con 0.2 ml de una suspensión que contiene 3 mg de bacilos.

Se sacrifica a los animales después de 6 semanas y se les examina por métodos macroscópicos y microscópicos, buscando evidencia de enfermedad.

Otra manera de producir la enfermedad en los ratones fué descrita por Selbie y O'Grady (1954). Se les inyecta a los ratones con M tuberculosis cepa H37 RV en el músculo del muslo y se mide la lesión a medida que va desarrollándose. Esta técnica puede usarse para probar a los agentes antifímicos en los ratones.

Pruebas Inmunológicas

Con el objeto de desarrollar una prueba útil en el diagnóstico de la tuberculosis se ha tratado de demostrar la existencia de anticuerpos circulantes. Con este propósito se han estudiado las alteraciones electroforéticas del suero de los enfermos tuberculosos.

La impureza de los antígenos usados en algunas reacciones inmunológicas ha dificultado caracterizar la posible especificidad de los anticuerpos circulantes encontrados.

De acuerdo con los métodos seguidos estas reacciones pueden clasificarse en:

- a) Reacciones de fijación de complemento.
- b) Reacción de aglutinación.
- c) Reacciones de precipitación.

A. Reacciones de Fijación de Complemento.

En 1901 Widal y Lesourd descubrieron anticuerpos fijadores de complemento en el suero de tuberculosos.

En 1903, Bordet y Gengou usaron como antígeno el bacilo tuberculoso.

En nuestro medio León en 1967 usó este tipo de reacción tomando como antígeno el polisacárido de M. tuberculosis.

Reacciones de aglutinación

En 1948 Middlebrook y Dubois sensibilizaron eritrocitos con polisacáridos extraídos del bacilo tuberculoso y describieron su reacción de hemaglutinación a la que consideraron con alto grado de especificidad.

En 1961 Takahashi y Ono aislaron una fracción lípida que llamaron fosfátida y la usaron como antígeno obteniendo mejor aglutinación de los eritrocitos sensibilizados con fosfatida. En 1966 Dubois y White, utilizaron la reacción de latex, sensibilizado con tuberculoproteína.

Reacciones de precipitación.

En 1956-1958 Parlett y Youmans, usaron reacciones de precipitación, empleando como antígenos filtrados de cultivos de M. tuberculosis, y consideraron que el objetivo de la prueba no se alcanzó en el grado esperado.

En 1968 Zamora, Bojalil y Bastarrachea, aislaron dos polisacáridos con actividad inmunológica, de N. asteroides y N. brasiliensis.

En 1965 Calderón y Alvarez, descubrieron una nueva técnica basada en el gasto de suero antigama globulina humana. El antígeno está constituido por bacilos de cultivo de 12 semanas en medio de Wigbrige, muertos por calor a 100°C.

Todavía esta en estudio la determinación de una prueba con determinación específica suficiente

para diferenciar la enfermedad activa de la inactiva y para el diagnóstico temprano de la tuberculosis.

Resumen y Conclusiones

Como se puede observar en la presente tesis, el estudio de la tuberculosis se remonta a tiempos muy antiguos, en los que el hombre ya luchaba contra esta temible enfermedad, hasta nuestros días - en que se han vislumbrado nuevos y amplios horizontes, a través de grandes investigadores que con tenacidad y perseverancia han logrado dar un paso para el avance de este estudio.

Dentro de la clasificación de Mycobacteria, vemos la cantidad de especies que han logrado clasificarse, con diferentes pruebas llevadas a cabo para su diferenciación, viendose que cada una de estas especies reaccionan de un modo diferente, y que gracias a esto se ha podido hacer dicha clasificación.

La composición química y las propiedades biológicas de M. Tuberculosis, nos da una base para seguir el proceso de la tuberculosis humana y los tipos de esta que se pueden presentar, como son: - la pulmonar, renal, meningítica, ósea, intestinal y miliar.

En el mecanismo de la alergia de las infecciones tuberculosas se ve el proceso de inmunización del individuo, dentro de este proceso también encontramos el llamado "Fenómeno de Koch".

Se menciona el mecanismo de las drogas utilizadas contra la tuberculosis, la combinación de estas para obtener una mayor eficacia incluso, se vé que algunas cepas ya presentan una marcada resis--

tencia, asimismo se mencionan las dosis a utilizar y las pruebas de sensibilidad a las que deben someterse las micobacterias, dentro de este mismo capítulo se señala el tratamiento, los efectos colaterales, y la toxicidad de algunos de estos medicamentos.

En las técnicas para la identificación de los diferentes tipos de micobacterias, tenemos una cantidad considerable que requiere de algunos reactivos peligrosos como son el bromuro de cianógeno que es cancerígeno. También se señalan otros métodos de análisis sencillos y menos peligrosos. Las pruebas de la catalasa y peroxidasa constituyen pruebas valiosas de escrutinio, para la identificación de Mycobacteria.

Las demás pruebas requieren de medios especiales y de reactivos más complicados para efectuarse, aunque tienen mayor especificidad. El origen de las muestras nos dará la localización bacilar, dentro de este origen tenemos que seguir una forma para tomar una muestra debidamente.

En general la toma de las muestras es de gran importancia, para la formulación del diagnóstico clínico. La muestra debe ser obtenida del sitio más adecuado para proporcionar el agente infeccioso y debe ser manejada de tal forma que favorezca la sobrevivencia y el crecimiento de este.

Las muestras deben ser representativas del proceso infeccioso y deben tratarse a la mayor brevedad.

Se hace hincapié en la toma de las muestras más comunes del laboratorio como son: esputo, orina, líquidos de punción, L.C.R., etc.

En el tratamiento de las muestras se especifican los cuidados que debe tener el laboratorista para el procesamiento adecuado y para obtener un mejor resultado.

En los métodos de identificación de Mycobacteria, está el examen bacteriológico con sus diferentes técnicas y microscopías para la identificación, estas técnicas van desde la más simple como es la de Zielh-Neelsen, hasta las microscopías - - fluorescentes.

En el capítulo referente a cultivos, vamos a encontrar una gran variedad de éstos, así como la preparación de dichos medios.

Para finalizar tenemos las pruebas in vivo - en animales de experimentación, como cobayos, conejos, ratones, etc.

Y las pruebas inmunológicas en las cuales su fundamento es la reacción antígeno anticuerpo.

- 1.- Mary A. Dudley and Hilda Pepe.- Comparison of-
M. tuberculosis and M. bovis - 1225. Vol. 12 -
No. 6 Dic. 1966. Canadian Journal Microbiology
American.
- 2.- S.A. Sattar and J.C.N. Westwood.- Inmunofluo--
rescence in the study of M. tuberculosis - - -
1489. Vol. 13 No. 11 Nov. 1967. Canadian Jour-
nal Microbiology Scientific American.
- 3.- Wilbur Jones and Arthur White.- Converson and-
activity of M. tuberculosis on the nitrato re-
ductasa - 551. Vol. 14 No. 5 Mayo 1968. Cana--
dian Journal Microbiology Scientific American.
- 4.- L. F. Elliot and W. J. Spangeer.- A chemical -
Method for culture purification - 479. Vo. 14-
No. 4 Abril 1968. Canadian Journal Microbiolog-
y Scientific American.
- 5.- B. B. Diena, H. Yugi, R. Wallace.- The flocula-
tion test in the serology of M. tuberculosis.-
I.- Purification of B.C.G. antigens. - 887 Vol.
14 No. 8. Agosto 1968. Canadian Journal Micro-
biology Scientific American.
- 6.- R. Wallace J. Carriere, B. B. Diena and L. - -
Greenberg.- The flocculation test in the serolo-
gy. II.- Detection of tuberculosis in Cattle -
915. Vol. 15 No. 5 Oct. 1968. Canadian Journal
Microbiology Scientific American.
- 7.- R. Turcotte.- The variation in the antigenics-
compositions on precipitationar reactions of -
M. tuberculosis. Vol. 15 No. 7 Julio 1969. Ca-
nadian Journal Microbiology Scientifici American.

- 8.- J. C. Muller.- Utilization of methane component of natural gas by a mixed culture of *M. tuberculosis*.- Vol. 15 No. 14 Sept. 1969. Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 9.- Wilbur D. Jones, Jr. And R. Edward Ben.- Lysogeny in the Mycobacteria. II.- Alterations of antigens mediated by Mycobacteriophage Vo. 15 No. 13 Oct. 1969. Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 10.- S. M. Martin and V. So.- Solubilization of autoclaved fathens and wool by Mycobacteria.- 1393. Vol. 15 No. 12 Dic. 1969. Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 11.- Howard D. Mc. Curdey.- Studie of the taxonomy of the Mycobacteria 1.- Record of Canadian isolates and survey methods.- 1453. Vol. 15 - No. 12 Dic. 1969. Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 12.- J. B. G. Kwapinsky, Alice Alcasid and Helen - Palser.- Serological relationships of antigens of saprophytic Mycobacteria.- 1263 Vol.- 16 No. 9 Enero 1970. Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 13.- J. B. G. Kwapinsky and Alece Alcasid.- Serological Relationships between Cytoplasm of Sco-tochromogenic Mycobacteria.- 1263 Vol. 16 No. 12 Dic. 1970. Canadian Journal Microbiology - Scientific American.

- 14.- R. Turcotte and R. P. Boulanger.- Comparison between the antigenic components extracted - - from virulent and avirulent strains of *Mycobacteria*.- 95. Vol. 17 No. 1 Junio de 1971. Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 15.- J. Menezes.- The fluorescent staining of a *Mycobacteria*.- 171 Vol. 17 No. 2 Feb. 1971. Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 16.- P. S. S. Dawsons and K. L. Phillips.- Alternate methods of nutrients dosing in the continuous phased culture.- 435 Vol. 17 No. 4 Abril 1971. Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 17.- J. B. G. Kwapinsky and Alice Alcasid.- Immunological characterization of antigens of non- - photochromogenic *Mycobacteria*.- 445. Vol. 18- No. 4 Abril 1972. Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 18.- R. Turcotte and Y. Desorme.- Influence of the age of *Mycobacterial* cultures on the protein- and carbohydrate composition of tuberculin.- 637. Vol. 18 No. 5 Mayo de 1972. Canadian - - Journal Microbiology Scientific American.
- 19.- J. B. G. Kawapinsky, Alice Alcasid.- The immunology of antigens of *Mycobacteria*.- 1201 Vol. 18 No. 7 Agost. 1972. Canadian Journal Microbiology Scientific American.

- 20.- Jack R. Matches and L. Liston.- Temperature - gradient incubator for the growth of *M. tuberculosis*.- 1161. Vol. 19. No. 9 Sept. 1973 Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 21.- David F. George Ling and Donn J. K.- Isoniazid metabolism and binding by sensitive and resistant strains of *M. Smegmatis*.- 757. Vol. - 18 No. 6 Junio 1972. Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 22.- J. Carriere, B. B. Diena and R. Wallace.- A new technique for obtaining surface culture - of Mycobacteria on liquid medium.- 1331. Vol. 19 No. 10 Oct. 1973. Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 23.- Edward E. Ishiguro.- Minimum nutritional requirements for growth of hosindependent derivatives of Micobacteria.- 263 Vol. 20 No. 2, - Feb. 1974. Scientific American Journal Microbiology.
- 24.- J. B. G. Kawapinsky and N.M.M. C. Clung.- The growgth of mycobacteria tuberculosis in snakes.- 400 Vol. 20 No. 3 Marzo 1974. Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 25.- Roger F. Hatcher and Bruce C. Parker.- Microbiological and chemical enrichment of freshwater surface microlayers relative to the bulk - surface eater.- 1051 Vol. 20 No. 7 Julio 1974. Canadian Journal Microbiology Scientific American.

- 26.- E. Mankiewicz, V. Curtis and H. Adomonis. The effect of Mycobacteria on cell mediated immunereactions.- 1209 Vol. 20 No. 9 sept. 1974.- Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 27.- A. P. Pugsley and Lilian M. Evison.- Immunofluorescence as a method for detection of M. Tuberculosis.- 1457 Vol. 20 No. 10 Oct. 1974. Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 28.- P. Chadwick, G. J. Delisle and M. Byer.- Biochemical identification of hospital Mycobacteriaby replica agar plating.- 1653 Vol. 20 No. 12 Dic. 1974. Canadian Journal Microbiology - Scientific American.
- 29.- R. P. Boulanger and B. Bortelance.- Preservations of Mycobacteria suspension.- 694. Vol.- 20 No. 5 Mayo 1975. Canadian Journal Microbiology Scientific American.
- 30.- B. J. Dutka and S. E. Tobur.- Study on the efficiency of four procedures for enumerating Mycobacteria.- 694 Vol. 22 No. 5 Mayo 1976. Canadian Journal Microbiology Scientific American.

1. GUIAS DE LABORATORIO
MYCOBACTERIUM - AISLAMIENTO IDENTIFICACION Y -
PRUEBAS DE SENSIBILIDAD.
B. W. ALLEN, F.I.M.L.T.
F. J. BAKER, F.I.M.L.T.
EDITORIAL
EL MANUAL MODERNO
MEXICO 11, D.F. 1976.
2. MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA
DR. ERNEST JAWETZ
DR. JOSEPH L. MELNICK
DR. EDWARD A. ADELBERG
EDITORIAL
EL MANUAL MODERNO
MEXICO 11, D.F. 1973.
3. APORTACIONES MEDICAS
LA TUBERCULOSIS PULMONAR
EPIDEMIOLOGIA, DIAGNOSTICO TERAPEUTICA
DR. LUIS ALCALA VALDES
EDITORIAL
INTERAMERICANA
PRIMERA EDICION 1970.
4. DICCIONARIO DE MEDICINA
EXPRESIONES TECNICAS Y TERMINOS MEDICOS
DR. E. DABOUT
DR. GUSTAVO ROUSSY
EDITORIAL NACIONAL
MEXICO 7, D.F. 1977.

5. TRATADO DE MICROBIOLOGIA
BERNARD D. DAVIS, M.D.
RENATO DULBECCO, M.D.
HERMAN N. EISEN, M.D.
SALVAT EDITORES, S.A. 1970.

6. METODOS DE LABORATORIO
DR. MATTHEW J. LYNCH
DR. STANLEY S. RAPHAEL
DR. LESLIE D. MELLOR
DR. PETER D. SPARE
DR. MARTIN J. H. INWOOD
EDITORIAL INTERAMERICANA
2a. EDICION 1970.

7. LA TUBERCULOSIS PULMONAR Y SUS COMPLICACIONES
DR. EDWAR W. HAYES Y COLABORADORES
EDITORIAL INTERCONTINENTAL 1970
COPIADO POR LA PRENSA MEDICA MEXICANA.

8. MICROBIOLOGIA MEDICA
PROF. EMILIO ZAPATERO
EDITORIAL SEVER
CUESTA VALLADOLID
1. EDICION 1974.

9. TECHNICAL INFORMATION
MEDIA FOR THE PRIMARY ISOLATION AND IDENTIFICA
CION OF MYCOBACTERIA PARTICULARY M. TUBERCULO-
SIS.
DIFCO LABORATORIES
DETROIT MICHIGAN U.S.A.
JUNE 1976.