

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACION DE UNA PRUEBA DE DETECCION  
DE MICOBACTERIAS DIRECTAMENTE DE  
MUESTRAS DE ESPUTO Y CULTIVOS JOVENES.**

**Por**

**Q.F.B. Carmen Amelia Molina Torres**

**Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRIA  
EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología Médica**

**Mayo, 2002**

TM  
RC311  
2  
M6  
c.1

THE  
MUSEUM  
OF  
ARTS  
AND  
CRAFTS  
LIBRARY



1080113754

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DE DETECCIÓN DE MICOBACTERIAS  
DIRECTAMENTE DE MUESTRAS DE ESPUTO Y CULTIVOS  
JÓVENES.**

**Por:**

**Q.F.B. Carmen Amelia Molina Torres**

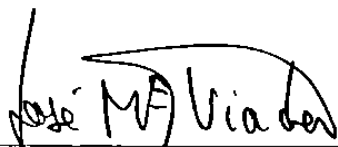
**Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con  
especialidad en Microbiología Médica**

**Mayo, 2002**



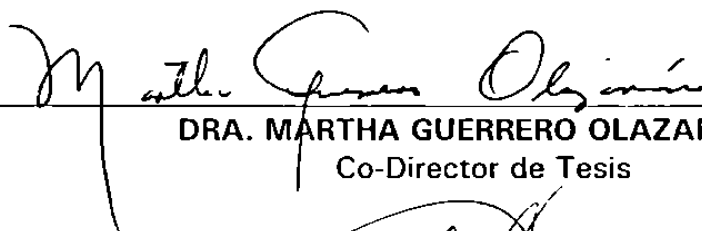
**EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DE DETECCIÓN DE MICOBACTERIAS  
DIRECTAMENTE DE MUESTRAS DE ESPUTO Y CULTIVOS JÓVENES**

**Aprobación de la Tesis:**



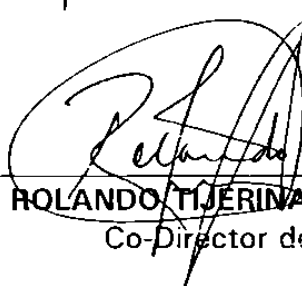
---

**DR. JOSÉ MARÍA VIADER SALVADÓ**  
Director de Tesis



---

**DRA. MARTHA GUERRERO OLAZARÁN**  
Co-Director de Tesis



---

**DR. ROLANDO TIJERINA MENCHACA**  
Co-Director de Tesis



---

**DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**  
Subdirector  
de Investigación y Estudios de Posgrado

A la memoria de mi Madre,  
quien me dio la luz y la dicha de vivir,  
que me enseñó entre muchas cosas a luchar.  
Estoy segura que sigue a mi lado en cada paso del sinuoso camino.

Bienaventurado ha de ser  
el que siembra para los otros  
el que en la semilla dejará  
un jirón de su propio ser.  
(Silvio Rodríguez)

Bienaventurada seas Madre!

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS por mis manos.

A mi Padre por su enorme paciencia, apoyo y amor en los momentos de desesperación.

A mis hermanos Marco, Diana, César, Liz y Rosy por aguantar las situaciones caseras que provoca un estudiante de postgrado y por esos (pocos) momentos en que podemos ser amigos.

A mis asesores de tesis: Dr. José Ma. Viader, Dra. Martha Guerrero y Dr. Rolando Tijerina por adoptarme como su alumna, por compartir pacientemente sus conocimientos y enseñarme a ser mejor profesionista.

A los químicos Ángeles Moncayo, Ramón Valdéz , Felipe Hernández y Alejandro por su amable y desinteresada colaboración en la realización de una gran parte de éste trabajo.

A todos los Maestros del Departamento de Microbiología quienes me han inculcado el respeto y amor hacia la microbiología.

A la Dra. Socorro Flores y la M.C. Elvira Garza por sus valiosos consejos y críticas para la tesis, así como por su apoyo moral fuera del laboratorio.

A todo el personal del Departamento de Microbiología, especialmente a Lucy, Rosaura, Héctor, Angeles, Sra. Eva y Carlos por permitirme invadir sus territorios para trabajar y por su valiosa amistad.

A mis compañeros Luis Lauro, Diana, Marco, Gloria, Rafael, Adrián, Iram, Irma, Magda, Abraham y Tere que con su amistad me ayudan a ser cada día mejor ser humano.

Al CONACYT y al proyecto PAYCIT por los apoyos económicos otorgados para la realización de éste trabajo.



## TABLA DE CONTENIDO

Cápítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Descripción de la Tuberculosis.....	1
1.2 Epidemiología .....	2
1.3 Etiología.....	3
1.4 Diagnóstico de la Tuberculosis.....	6
1.5 Diagnóstico por el laboratorio.....	7
1.5.1 Microscopía para detección de Baar .....	7
1.5.2 Cultivo bacteriológico .....	8
1.5.3 Sistemas de cultivo automatizados.....	9
1.5.4 Amplificación de ácidos nucleicos.....	10
1.5.5 Métodos inmunológicos.....	11
1.5.6 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	12
1.6 Antecedentes.....	13
1.6.1 Ácido micólicos.....	13
1.6.2 Diferenciación de especies de <i>Mycobacterium</i> por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	14
1.7 Justificación .....	16
1.8 Objetivos del trabajo.....	16
1.8.1 Objetivo general.....	16
1.8.1 Objetivos específicos .....	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1 Área de trabajo y equipo .....	18
2.2 Material biológico .....	19
2.3 Estrategia general .....	20
2.4 Medidas de bioseguridad.....	21
2.5 Digestión y descontaminación de las muestras.....	23
2.6 Cultivo en Lowenstein-Jensen .....	24
2.6.1 Procedimiento para la siembra .....	24
2.6.2 Evaluación del crecimiento en L-J.....	25
2.6.3 Identificación de micobacterias.....	26
2.6.3.1 Primer nivel de diferenciación .....	26
2.6.3.2 Segundo nivel de diferenciación de micobacterias.....	28

2.6.4 Tratamiento para el análisis de ácidos micólicos .....	30
2.7 Baciloscopia.....	30
2.7.1 Preparación del extendido .....	30
2.7.2 Tinción del extendido.....	31
2.7.3 Observación microscópica.....	31
2.7.4 Evaluación de los resultados.....	33
2.8 Cultivo en medio Middlebrook 7H9 .....	33
2.8.1 Procedimiento para la siembra.....	33
2.8.2 Inactivación del cultivo y saponificación.....	34
2.9 Muestra directa.....	34
2.9.1 Inactivación y saponificación.....	34
2.10 Extracción y derivatización de ácidos micólicos. ....	35
2.11 Análisis cromatográfico de los ácidos micólicos .....	36
2.11.1 Criterios para detectar la presencia de ácidos micólicos .....	37
2.11.2 Criterios para la identificación de <i>M. tuberculosis</i> por CLAR .....	37
2.12 Comparación de los resultados de las baciloscopías vs el ATAM de las muestras directas y el cultivo joven .....	38
2.13 Comparación de los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de las muestras directas y sus correspondientes CJ y cultivos en L-J positivos ....	39
2.14 Comparación de la identificación de especie en los cultivos en L-J por análisis de AM y pruebas bioquímicas .....	39
2.15 Comparación de la detección de micobacterias en las baciloscopías, el análisis de AM en muestras directas y el análisis de AM en CJ vs la detección de micobacterias en los cultivos en L-J .....	39
3. RESULTADOS.....	42
3.1 Resultados de la detección de micobacterias en las diversas pruebas realizadas.....	42
3.2 Comparación de los resultados de las baciloscopías vs el ATAM de las muestras directas y el cultivo joven.....	43
3.3 Comparación de los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de las muestras directas y sus correspondientes CJ y cultivos en L-J positivos .....	44
3.4 Comparación de la identificación de especie en los cultivos en L-J por análisis de AM y pruebas bioquímicas .....	45
3.5 Comparación de la detección de micobacterias en las baciloscopías, el análisis de AM en muestras directas y el análisis de AM en CJ vs la detección de micobacterias en los cultivos en L-J .....	46
4. DISCUSIÓN.....	48
5. CONCLUSIONES .....	53
6. REFERENCIAS .....	55

7. APÉNDICES

APÉNDICE A. RESULTADOS DE EXÁMENES REALIZADOS .....	61
APÉNDICE B. CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE M. <i>tuberculosis</i> POR CLAR.....	67
APÉNDICE C. PREPARACIÓN DE REACTIVOS .....	70

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Valores de ATAM de muestras de expectoración y cultivos jóvenes a 10 días vs número de cruces de la baciloscopía.....	44
II. Comparación entre las distintas pruebas realizadas y el cultivo en L-J.....	46
III. Reproducibilidad del tiempo de retención y altura relativa de los picos cromatográficos de <i>M. tuberculosis</i> .....	68

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Tasa de morbilidad por Tuberculosis pulmonar en Nuevo León, comparada con la tasa media nacional de 1990-2000 .....	3
2. Representación esquemática de la pared celular de las micobacterias .....	6
3. Fórmula general de los ácidos micólicos .....	13
4. Esquema de la estructura de los ácidos micólicos unidos a la porción distal del arabinogalactano .....	14
5. Estrategia general del presente trabajo.....	22
6. Recorrido para efectuar la lectura por cien campos microscópicos.....	32
7. Patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de <i>M. tuberculosis</i> en muestras directas de expectoración .....	37
8. Patrón cromatográfico característico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de <i>M. tuberculosis</i> .....	38
9. Patrón cromatográfico característico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de <i>M. tuberculosis</i> .....	69

## NOMENCLATURA

$\mu\text{L}$	Microlitros
AM	Ácidos micólicos
ATAM	Área total de los picos cromatográficos identificados como ácidos micólicos
BAAR	Bacilos ácido alcohol resistentes
CJ	Cultivo joven
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	Food and Drug Administration
HEPA	High efficiency particulate air
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
kDA	Kilodaltons
lb	Libras
L-J	Lowenstein-Jensen
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex
M.	<i>Mycobacterium</i>
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health

PPD	Purified protein derivated
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TB	Tuberculosis
UFC	Unidades formadoras de colonia
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

## RESUMEN

Carmen Amelia Molina Torres  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Mayo de 2002

Título del estudio: **EVALUACIÓN DE UNA PRUEBA DE DETECCIÓN DE  
MICOBACTERIAS DIRECTAMENTE DE MUESTRAS DE  
ESPUTO Y CULTIVOS JÓVENES.**

Número de páginas: 73

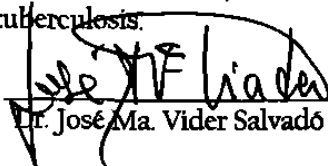
Candidata para el grado de Maestría en Ciencias  
con Especialidad en Microbiología Médica

Area de estudio: Microbiología Médica

**Objetivo y Método del estudio:** La rápida detección e identificación de micobacterias en muestras clínicas es de gran importancia para un oportuno control y prevención de la tuberculosis (TB). El cultivo bacteriológico es el método más sensible y específico de los que se conocen para detectar micobacterias, sin embargo es un método muy lento (3 a 4 semanas). Por tal motivo se recurre a la baciloscopia pero frecuentemente se detectan nuevos casos de TB con baciloscopias negativas. El empleo de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para el análisis de ácidos micólicos (AM) ha mostrado ser un método rápido y reproducible para la identificación de micobacterias a partir de cultivos, pero también se ha observado que muestras de esputo de baciloscopias positivas de 1+ generan picos cromatográficos de derivados fluorescentes de AM distinguibles frente al ruido analítico. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar una prueba de detección de micobacterias directamente de muestras de esputo y cultivos jóvenes a través del análisis de derivados fluorescentes de AM. Se analizaron 154 muestras de esputo, a las cuales se les realizaron baciloscopias, análisis de AM, cultivos en medio Lowenstein-Jensen (L-J), análisis de AM de cultivos jóvenes en medio líquido Middlebrook 7H9, y análisis de AM y pruebas bioquímicas de cultivos positivos en medio L-J. Se compararon entre sí los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de las muestras de expectoración y sus correspondientes cultivos jóvenes y cultivos positivos. Se comparó la identificación de los cultivos positivos realizada por pruebas bioquímicas y por el patrón cromatográfico de AM. Además, se compararon los resultados de la baciloscopia, el análisis de AM en muestras directas y el análisis de AM en cultivos jóvenes con los obtenidos en el cultivo normal en L-J.

**Contribuciones y conclusiones:** Se encontró que 83 de 84 (98.8%) de los patrones cromatográficos de las muestras directas y cultivos jóvenes coincidieron con los obtenidos en el cultivo de L-J. En los 84 cultivos que resultaron positivos en L-J, coincidió la identificación de la especie mediante el patrón cromatográfico de AM y las pruebas bioquímicas, identificándose 81 (96.4%) aislamientos clínicos como *M. tuberculosis* y 3 (3.6%) como no *M. tuberculosis*. Se obtuvieron los porcentajes de concordancia y los porcentajes de detección de la baciloscopia, análisis de AM de muestras directas y análisis de AM en cultivos jóvenes a 10 días en pacientes con y sin tratamiento, comparados frente al cultivo en L-J obteniéndose un 76% y 91.9%, 60.1% y 43.8%, 76.9% y 88.7%, 75% y 96.4%, respectivamente. El mayor porcentaje de detección de micobacterias mediante el análisis de ácidos micólicos se logró en los cultivos jóvenes a 10 días en pacientes sin tratamiento antifímico, siendo ésta la mejor alternativa para la detección temprana de casos de tuberculosis.

FIRMA DEL ASESOR:

  
Dr. José Ma. Vider Salvadó

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Descripción de la Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* y excepcionalmente por *M. bovis*, que se caracteriza por la formación de granulomas en los tejidos. Aunque se trata principalmente de una enfermedad pulmonar, también puede afectar a los restantes órganos. El curso de la enfermedad es crónico y puede conducir a la muerte si el paciente no recibe tratamiento. Aunque esta enfermedad es bien conocida desde la antigüedad, los últimos años y, especialmente, la aparición del SIDA, han condicionado un cambio radical en su epidemiología y existe una enorme preocupación en todo el mundo por su resurgimiento y por el incremento de resistencia a los fármacos más importantes. De hecho, son necesarias grandes novedades terapéuticas y diagnósticas en una enfermedad en cuyo conocimiento se ha hecho hincapié en los últimos años. Existen evidencias paleológicas de TB espinal en restos neolíticos precolombinos y egipcios. Sin embargo, la TB se convirtió recientemente en un problema grave en el momento en que el hacinamiento en los medios urbanos asociado con la Revolución Industrial generó circunstancias epidemiológicas que favorecieron su propagación. En los siglos XVII y XVIII la TB fue responsable de una cuarta parte de todas las muertes en adultos que se produjeron en Europa (33, 41).



## 1.2 Epidemiología

La TB mata 2 millones de personas cada año. La epidemia global está creciendo y llegando a ser más peligrosa. El deterioro en los sistemas de salud, la diseminación del VIH/SIDA y la emergencia de cepas multidrogoresistentes están contribuyendo a un peor impacto de ésta enfermedad. En 1993 la Organización Mundial de la Salud tomó una decisión sin precedente y declaró a la tuberculosis como emergencia global. Se estima que entre el año 2000 y 2020, aproximadamente un billón de personas será infectada nuevamente, 200 millones de personas adquirirán la enfermedad, y 35 millones morirán de TB si el control de la enfermedad no se intensifica. Según datos de la OMS, cerca de 1% de la población mundial es nuevamente infectada con TB cada año y en total, una tercera parte de la población mundial está actualmente infectada con el bacilo de la tuberculosis (35).

En términos de número de casos, la mayor carga de TB es en el Sudeste de Asia (35). Cerca de 1.5 millones de casos de TB por año ocurren en África Subsahara. Este número está incrementando rápidamente como resultado de epidemias de VIH/SIDA. Casi 3 millones de casos de TB ocurren en el Sudeste de Asia y cerca de un cuarto de millón de casos ocurren en Europa del Este (35).

Aunque no existen datos actuales de la prevalencia de esta enfermedad en México, en la última década también se ha observado un incremento en la incidencia, teniendo hasta 1998 una tasa de morbilidad de 22.3 por 100,000 habitantes (20). Precisamente en este año, el estado de Nuevo León ocupó el tercer lugar en tasa de morbilidad con un valor de 39.9 por 100,000 habitantes, además esta enfermedad ocupa el décimo lugar en causa de muerte en personas económicamente activas (20) (Fig. 1).

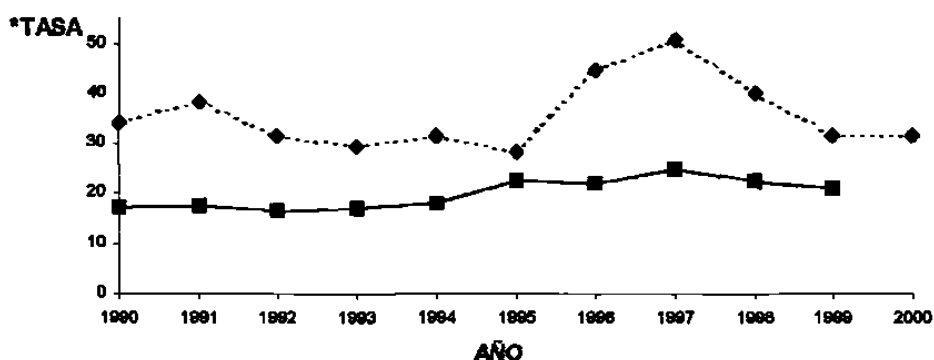


Fig. 1. Tasa de morbilidad por tuberculosis pulmonar en Nuevo León (---◆---), comparada con la tasa media nacional (—■—) de 1990-2000. \* Tasa por 100,000 habitantes. Ref. 20

### 1.3 Etiología

Las micobacterias pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae* del orden *Actinomycetales*, subclase *Actinobacteridae*, phylum *Actinobacteria*, dominio *Bacteria*. El género *Mycobacterium* es el único en la familia *Mycobacteriaceae* (33).

Robert Koch fue el primero en establecer la relación causal entre el bacilo tuberculoso y la enfermedad tuberculosis. La denominación bacilo tuberculoso incluye el complejo de *M. tuberculosis* conformado por *M. tuberculosis* y *M. bovis*, capaces de producir esta enfermedad en el ser humano, y otras tres especies estrechamente relacionadas, *M. bovis* BCG, *M. microti* y *M. africanum*, que suelen causar enfermedad preferentemente en animales. El organismo fue nombrado *Mycobacterium tuberculosis* en 1886, presumiblemente por su parecido a un hongo en su lento crecimiento y morfología colonial (33).

Además de *M. tuberculosis*, existen otras especies clínicamente importantes. Los organismos del complejo de *Mycobacterium avium* (*M. avium* y *M. intracellulare*) son ubicuos

en la naturaleza, de baja patogenicidad y frecuentemente colonizan individuos sin causarles enfermedad, sin embargo con el advenimiento del SIDA, *M. avium* ha llegado a ser la especie mas común de las micobacterias no tuberculosas asociada a enfermedad en humanos. *M. abscessus* es la responsable de casi el 90% de los casos de enfermedad pulmonar crónica debida a especies de lento crecimiento. *M. chelonae* es la especie más probable de ser encontrada en pacientes inmunosuprimidos, la enfermedad clínica debida a ésta es una enfermedad nodular diseminada de la piel. Hay otras micobacterias que con frecuencia se aíslan del medio ambiente pero son consideradas potencialmente patógenas para el ser humano, y son las siguientes: *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. ulcerans* y *M. xenopi*. Las especies pertenecientes al complejo de *M. fortuitum* difieren en su espectro clínico. Diversas especies de lento crecimiento son recobradas frecuentemente pero raramente se asocian a enfermedades humanas, y son mejor caracterizadas como no patógenas (tal como *M. asiaticum*, *M. gastri* y *M. gordonae*). Otras especies (tal como *M. asiaticum* o *M. shimoidei*) son patógenas pero son tan escasamente recuperadas que la mayoría de los laboratorios nunca las detecta (33).

Las micobacterias son bacilos rectos o ligeramente curvados, con tamaño de 0.2 a 0.6 por 1-10  $\mu\text{m}$  de diámetro (33). La pared de las micobacterias posee un alto contenido de lípidos que la hace impermeable a los agentes hidrofílicos, por lo tanto estos microorganismos no se tiñen adecuadamente con los reactivos utilizados en la coloración de gram y no pueden ser clasificados como gram positivos o negativos, aunque se les considera gram positivos.

Las micobacterias son teñidas adecuadamente por el método de Ziehl-Neelsen (tinción ácido alcohol resistente) y una vez coloreados son resistentes a la decoloración ácido-alcohólica, por lo que se denominan Bacilos Ácido Alcohol Resistentes (BAAR) (6, 33). Los microorganismos del género *Mycobacterium* contienen una membrana citoplasmática formada por una bicapa lipídica similar a las restantes bacterias, la cual permanece bajo el rígido peptidoglicano (PG). Un gran número de proteínas que están unidas en asociación con el PG y entre la membrana y el PG, son utilizadas con fines diagnósticos (PPD). Continuando hacia el exterior, el PG está covalentemente unido por medio de enlaces fosfodiéster a arabinogalactano (AG), un polímero de arabinosa y galactosa. Los ácidos micólicos, que son  $\beta$ -hidroxiácidos de cadenas carbonadas largas (C60 a C90), están unidos covalentemente a la porción distal del AG. Los micolatos de trealosa (llamados 'factores cordón' porque su presencia produce cultivos que tienen forma de cordones serpenteantes) y los sulfolípidos se encuentran principalmente en las cepas de micobacterias más virulentas. El lipoarabinomanano (LAM) es un compuesto que se halla anclado en la membrana citoplasmática. El LAM es considerado como el equivalente micobacteriano del lipopolisacárido de las Gram negativas debido a que provoca una importante respuesta antimicrobiana en macrófagos. En las cepas de micobacterias más virulentas, la arabinosa terminal del LAM está recubierta con residuos de manosa, (manLAM) a diferencia de las cepas no virulentas que no están recubiertas de éste monosacárido (AraLAM) (6, 22, 33) (Fig. 2).

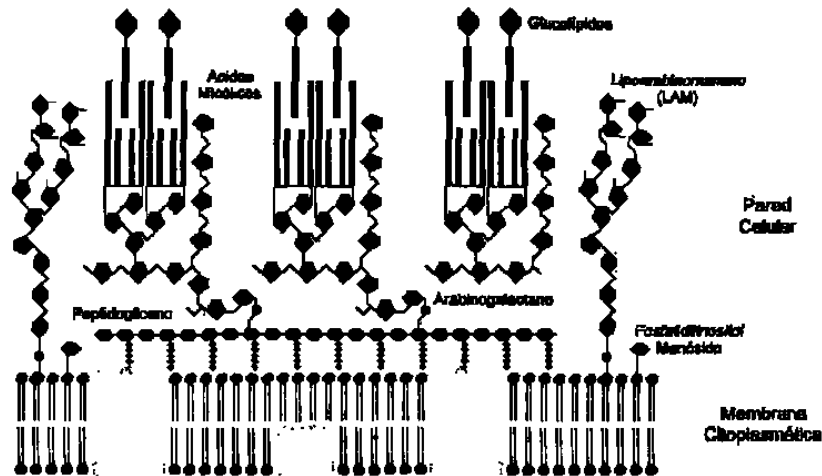


Fig. 2. Representación esquemática de la pared celular de las micobacterias. Ref. 6.

Las micobacterias son aeróbicas, no formadoras de esporas y bacilos inmóviles. La morfología colonial y la pigmentación varía entre las especies. Algunas especies requieren luz para formar pigmento (fotocromógenas), y otras forman pigmento en la luz y en la oscuridad (escotocromógenas). La velocidad de crecimiento de las micobacterias es lenta a muy lenta, con tiempos de generación que varía en las distintas especies de 2 a 20 horas. Las temperaturas óptimas de crecimiento varían de 30 a casi 45°C. La mayoría de las especies se adaptan fácilmente para crecer sobre sustratos simples, usando amonio o aminoácidos como fuente de nitrógeno y glicerol como fuente de carbono en presencia de sales minerales. Algunas especies requieren suplementos tales como hemina, micobactinas, u otros compuestos para el transporte de hierro. *M. leprae* no ha sido cultivado fuera de las células vivas (33).

#### 1.4 Diagnóstico de la Tuberculosis

La clave para el diagnóstico de la tuberculosis es el mantenimiento de un elevado índice de sospecha. El diagnóstico no es difícil en los pacientes de alto riesgo, por ejemplo,

una persona alcohólica sin hogar que presenta síntomas típicos y hallazgos clásicos en la radiografía de tórax con infiltrados en lóbulo superior y cavidades. Por otra parte, el diagnóstico puede ser fácilmente pasado por alto en el anciano ingresado en una residencia o en el adolescente que presenta un infiltrado focal. Con frecuencia el diagnóstico se considera por primera vez cuando se observan alteraciones en la radiografía de tórax de un paciente que está siendo estudiado debido a una sintomatología respiratoria (39).

## 1.5 Diagnóstico por el Laboratorio

La rápida identificación de micobacterias es de gran importancia para un oportuno control y prevención de la tuberculosis, así como una terapia óptima de la enfermedad. El diagnóstico de laboratorio incluye una amplia gama de métodos, siendo los más usados la baciloscopia o tinción ácido-alcohol resistente y el cultivo bacteriológico. Además de los métodos anteriores, existen otros métodos alternativos de detección e identificación de micobacterias como son los sistemas de cultivos automatizados, la amplificación e hibridación de ácidos nucleicos y las técnicas inmunológicas.

### 1.5.1 Microscopía para detección de BAAR

El examen microscópico de especímenes respiratorios para la investigación de bacilos juega un papel importante en el diagnóstico inicial de la tuberculosis. Las micobacterias son capaces de formar complejos estables con ciertos colorantes derivados de arilmetano como la fuscina y la auramina O. Aunque la naturaleza exacta de la tinción ácido-alcohol-resistente (Ziehl-Neelsen) no está por completo entendida, el fenol en la tinción primaria permite la penetración del colorante. La pared celular con residuos de ácidos micólicos

retiene el colorante primario aún después de exponerse a ácido alcohol o a ácidos minerales fuertes (33). Esta resistencia a la decoloración es requerida para que un organismo sea llamado ácido alcohol resistente (*acid-fast*). Aunque esta prueba es inespecífica para micobacterias, ya que también se detectan otras bacterias ácido-alcohol resistentes como las del género *Nocardia*, es muy utilizada por los laboratorios clínicos debidos a su bajo costo y rapidez con que se obtiene el resultado. La sensibilidad de las baciloscopías de esputo con 3 muestras directas consecutivas es del 81% y en muestras concentradas la sensibilidad es de 91% (37). Aunque existen en el mercado otros procedimientos de tinción más sensibles como la tinción fluorocrómica, en México la tinción de Zhiel-Neelsen sigue siendo la prueba de elección. En Nuevo León se han reportado hasta un 11% de nuevos casos con baciloscopías negativas, por lo tanto, existe la necesidad de identificar éstas oportunamente (20).

### 1.5.2 Cultivo bacteriológico

El cultivo bacteriológico acompañado de pruebas bioquímicas es uno de los métodos más sensibles y específicos de los que se conocen para descubrir en una muestra a las micobacterias, y es considerado el estándar de oro para los demás métodos de detección. Sin embargo, es un método muy lento (4-8 semanas) para proporcionar una información relevante (33). Muchos medios diferentes se encuentran disponibles para la recuperación de micobacterias e incluyen medios selectivos y no selectivos, estos últimos conteniendo uno o más antibióticos para prevenir el sobrecrecimiento de bacterias y hongos contaminantes. Los medios líquidos son los preferidos para el aislamiento primario de las micobacterias. El medio sólido puede ser a base de huevo como el Lowenstein-Jensen (L-

J) o a base de agar (Middlebrook 7H10); todos ellos contienen verde de malaquita, un colorante que suprime el crecimiento de bacterias contaminantes. Aunque el medio a base de agar permite una detección más temprana de las micobacterias, el medio L-J a menudo produce un número mayor de cultivos positivos en incubación prolongada. El uso de medios sólidos presenta la ventaja de detectar cultivos mixtos, además de observar la morfología colonial, la cual provee claves para la identificación y facilita la selección de pruebas confirmatorias incluyendo pruebas genéticas. El medio L-J es el más comúnmente usado en los laboratorios clínicos y de referencia en nuestro país (4, 33).

### 1.5.3 Sistemas de Cultivo Automatizado

Dentro de los métodos de cultivo automatizados se encuentran el BACTEC (Radiométrico) y el MbBacT (Colorimétrico), los cuales permiten detectar el crecimiento de las micobacterias en menos tiempo que los métodos convencionales. En éstos se emplea un medio líquido con un sustrato que al ser metabolizado por las micobacterias desprende CO<sub>2</sub> a la atmósfera del frasco, y éste es detectado como CO<sub>2</sub> marcado radioactivamente en el BACTEC o en el MbBacT por medio de un sensor permeable a gas que contiene un indicador colorimétrico embebido en el fondo de los viales del cultivo (33, 38). El uso de estas técnicas permite una temprana recuperación y detección de cultivos positivos y un menor riesgo de contaminación cruzada comparados con el cultivo en medio sólido de Lowenstein-Jensen (38). Sin embargo, también presentan desventajas como el alto costo y la incapacidad de observar la morfología colonial; además en el BACTEC, el uso de material radioactivo precisa cumplir ciertos requisitos para su manejo (33, 38).



#### 1.5.4. Amplificación e Hibridación de Ácidos Nucleicos

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de la tuberculosis han tenido un interés considerable, particularmente con la esperanza de acortar el tiempo requerido para detectar e identificar *M. tuberculosis* en muestras del tracto respiratorio. Los ensayos de amplificación directa han sido empleados y evaluados de manera extensa, pero solo dos ensayos comerciales han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA), para especímenes con baciloscopia positiva (13). El primero de ellos, el Gen Probe Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (Gen-Probe, San Diego, Calif.) se basa en la retrotranscripción específica del RNA ribosomal 16S micobacteriano, posterior amplificación isotérmica mediante un proceso de transcripción con una RNA polimerasa e hibridación específica con una sonda de DNA quimioluminiscente complementaria a secuencias específicas del complejo *M. tuberculosis*. El segundo de ellos, el Amplicor Mycobacterium tuberculosis test (Roche Diagnostics Systems, Basel, Switzerland), está basado en la amplificación de un fragmento de DNA de genes que codifican para el RNA ribosomal micobacteriano y el fragmento amplificado se identifica con sondas de DNA específicas. Otro ensayo de amplificación ha sido recientemente introducido, el LCx Mycobacterium tuberculosis Assay (LCx assay) (Abbott Laboratories, Chicago, Ill.), el cual está basado en la reacción en cadena de la ligasa. Estos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos usan un sistema automatizado que permite la detección directa de *M. tuberculosis* en muestras clínicas.

Otros blancos de amplificación propuestos son genes que codifican proteínas antigénicas como la de 32 kDa, 38 kDa y la de 65 kDa y los genes *dnaJ*, *groEl*, y *mtb-4*. Algunos de éstos ensayos son género o grupo-específicos, que requieren subsecuente

tratamiento con enzimas de restricción o hibridación para identificación de especie. El blanco más frecuentemente amplificado es el elemento repetitivo IS986 o IS6110, el cual está presente en 10 a 16 copias en el genoma de la mayoría de los aislamientos de *M. tuberculosis*. Sin embargo, recientemente, se han detectado aislamientos cuyo genoma no presenta este elemento de inserción (27). Los resultados de sensibilidad en comparación con el cultivo y el diagnóstico clínico que han sido reportados en la literatura reciente, varían dentro de un rango de 80 a 92% para las pruebas de PCR no comerciales (1, 16, 23), 67 a 87% para el Amplicor (19, 35, 45), 82 a 98% para el GeneProbe Direct Test (1, 28, 45), y 78 a 96% para el LCx Assay (24, 32). Para todos estos métodos la especificidad es siempre excelente, de 96 a 100%. Aunque estas pruebas han mostrado enormes ventajas por su rapidez, no pueden reemplazar los métodos de diagnóstico convencionales, especialmente porque las cepas deben ser cultivadas para las pruebas de susceptibilidad. La decisión de la FDA está igualmente justificada: el uso de éstas pruebas rápidas debe estar restringida a muestras con baciloscopia positiva de pacientes con tuberculosis sin tratamiento y usadas solo en conjunción con los exámenes tradicionales de esputo. Estas no deben ser usadas para muestras de esputo con baciloscopia negativa o para otro tipo de muestras como líquido pleural o fluido cerebroespinal, debido a la baja sensibilidad en este tipo de muestras (27). Aunado a esto, las mayoría de las pruebas de amplificación solo detectan un número limitado de especies (34).

### 1.5.5 Métodos inmunológicos

La mayoría de los ensayos realizados están basados en la detección de anticuerpos específicos circulantes. El serodiagnóstico de la tuberculosis ha estado sujeto a

investigación por largo tiempo, pero todavía no existe una prueba con amplia utilidad clínica. Las pruebas disponibles tienen una sensibilidad y especificidad de alrededor del 80% (17). En pacientes seropositivos al VIH coinfectados con tuberculosis, la sensibilidad de las pruebas para detectar anticuerpos es mucho más baja, entre 10 y 40% (7). Los antígenos micobacterianos han sido detectados por ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) en esputo (46), y fluido cerebroespinal (30). El lipoarabinomano (LAM), un componente abundante de la pared micobacteriana, ha sido detectado en el suero (40) y esputo (18) de pacientes con tuberculosis. Aunque los resultados de la detección de este antígeno en muestras de esputo son prometedores, su utilidad está todavía bajo evaluación y no ha tenido amplio uso para el diagnóstico de tuberculosis activa (36).

#### 1.5.6 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

Por otro lado, también se han desarrollado procedimientos analíticos como la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) que detecta lípidos micobacterianos característicos llamados ácidos micólicos. Los ácidos micólicos son  $\beta$ -hidroxiácidos- $\alpha$ -alquil ramificados de alto peso molecular componentes de la pared celular de microorganismos de los géneros *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Gordona*, *Wilamsia*, *Skermania*, *Tsukumarella* y *Mycobacterium* y cuya presencia en una muestra clínica o en un cultivo aislado, indicaría la presencia de microorganismos de estos géneros.

## 1.6 Antecedentes

### 1.6.1 Ácidos micólicos

El análisis de la fracción lipídica ha contribuido significativamente al conocimiento de las especies de micobacterias. La abundancia de constituyentes lipídicos en la pared celular micobacteriana los hizo clásicos candidatos para investigaciones químicas tempranas. De intenso interés para los investigadores fue una fracción grasosa difícil de purificar, inicialmente llamada 'cera insaponificable' (42). Aislados después de una prolongada saponificación, este residuo fue clarificado como un alcohol insoluble, hidroxi-ácido de alto peso molecular. La fracción saponificada fue químicamente estable y fue nombrada 'ácidos micólicos', siguiendo su aislamiento de la cepa original H37 de *M. tuberculosis*. Químicamente la fracción de ácidos micólicos teñida ácido alcohol resistente, contiene grupos hidroxí y metoxi con cadenas largas de 88 átomos de carbono aproximadamente, y desplegó un producto de pirólisis con 26 átomos de carbono cuando se calentó a 300-350°C (42). Más estudios estructurales confirmaron que los grupos hidroxí de los ácidos micólicos estaban en la posición  $\beta$  del grupo carboxilo y así se definieron los ácidos micólicos como  $\beta$ -hidroxí-ácidos de alto peso molecular con una cadena lateral  $\alpha$  (3) (Fig. 3). El valor diagnóstico de los ácidos micólicos fue rápidamente reconocido por diversos investigadores, quienes caracterizaron los diferentes géneros que contienen ácidos micólicos (2, 21, 31)

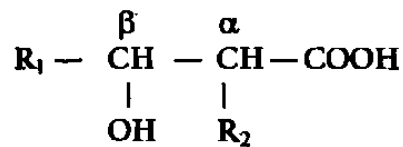


Fig. 3. Fórmula general de los ácidos micólicos.

### 1.6.2 Diferenciación de especies de *Mycobacterium* por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

En 1986 W.R. Butler *et al.* desarrollaron un método para el análisis de derivados de ésteres p-bromofenacílicos de los ácidos micólicos empleando la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), y lograron diferenciar especies de los géneros de *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Mycobacterium* mediante los patrones cromatográficos de los ácidos micólicos (9), debido a que la longitud en las cadenas de átomos de carbono, el grado de insaturación y otros grupos funcionales de los ácidos micólicos son distintos en los diferentes géneros que los contienen (Fig. 4). Posteriormente, en 1991, establecieron un esquema de diferenciación de especies micobacterianas mediante su patrón cromatográfico de ácidos micólicos comparando el tiempo de retención relativo de los picos cromatográficos y la relación de altura de éstos. Éste esquema tuvo un 98% de exactitud para las especies examinadas, y proporcionó una alternativa para la identificación rápida de especies a partir de cultivos (8, 10).

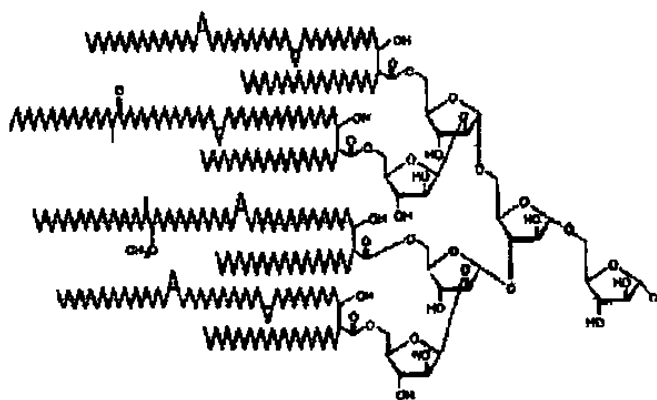


Fig. 4. Esquema de la estructura de los ácidos micólicos unidos a la porción distal del arabinogalactano.

En 1995, Jost *et al.* propusieron el empleo de derivados fluorescentes 4-bromometil-6,7-dimetoxicumarínicos de ácidos micólicos para diferenciar diversas especies de micobacterias en muestras clínicas y en cultivos jóvenes en medio BACTEC12B, aumentando 200 veces la sensibilidad de la detección respecto a los derivados p-bromofenacílicos (29). Debido a la excelente sensibilidad analítica de la fluorescencia, el uso de ésta en lugar de la absorción UV para la detección de los patrones de los ésteres de ácidos micólicos disminuyó considerablemente de 19 días a 12 días, el tiempo requerido para la identificación de micobacterias a partir de cultivos. Aunque el método aplicado a muestras directas con baciloscopia positiva mostró baja sensibilidad, permitió la identificación temprana de MTB en muestras con gran cantidad de bacilos (29).

En 1996 el comité directivo del grupo de usuarios de CLAR publicó un método estandarizado para la identificación de micobacterias a través de los derivados p-bromofenacílicos de los ácidos micólicos analizados por CLAR, estableciéndose los patrones característicos para 20 especies (11).

En 1997 Garza-González *et al.* describieron una relación lineal entre el área total de los picos identificados como ácidos micólicos (ATAM) y el log de las UFC/mL obtenidas por cuenta en placa, mostrando la posibilidad de usar el ATAM como un indicador del crecimiento micobacteriano y por lo tanto como una herramienta para probar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* (26).

En 1998 Garza-González *et al.* describieron que muestras de baciloscopias positivas 1+ generan picos cromatográficos de derivados fluorescentes distinguibles del ruido analítico (23).

En 2000 y 2001 Viader-Salvadó *et al.* describieron un método para determinar la

susceptibilidad de *M. tuberculosis* a isoniazida y rifampicina usando aislamientos clínicos y basándose en la medida del índice de los ácidos micólicos a través del ATAM (43, 44).

Estos antecedentes hicieron pensar que el análisis de ácidos micólicos por CLAR de muestras clínicas directas podría proporcionar una nueva aplicación a este análisis ya que permitiría realizar una identificación del género y especie del microorganismo en menos de 24 horas después de llegar la muestra clínica al laboratorio y además la posibilidad de detectar falsos negativos de baciloscopías (25). Este método podría ser un apoyo para los métodos rutinarios de análisis que consumen mucho tiempo así como a las costosas pruebas genéticas comercialmente disponibles. Con esta idea, el presente proyecto tiene la siguiente justificación:

## 1.7 Justificación

El empleo de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para el análisis de ácidos micólicos a muestras clínicas directas y/o cultivos jóvenes permitiría la identificación del género y especie del microorganismo en un tiempo corto después de llegada la muestra clínica al laboratorio.

## 1.8 Objetivos del Trabajo

### 1.8.1 Objetivo general

Evaluar una prueba para la identificación de micobacterias, directamente de muestras de esputo y/o cultivos jóvenes.

### 1.8.2 Objetivos específicos

1. Realizar baciloscopías, análisis de ácidos micólicos y cultivos de muestras de expectoración.
2. Realizar el análisis de ácidos micólicos de cultivos jóvenes.
3. Realizar el análisis de ácidos micólicos y pruebas bioquímicas en los cultivos en L-J positivos.
4. Comparar los resultados de las baciloscopías expresados en cruces con el ATAM de las muestras directas y de los cultivos jóvenes.
5. Comparar entre sí los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de las muestras directas y sus correspondientes cultivos jóvenes y cultivos en L-J positivos.
6. Comparar la identificación de los cultivos en L-J positivos realizada por pruebas bioquímicas y por el patrón cromatográfico de ácidos micólicos.
7. Comparar la detección de micobacterias en las baciloscopías, el análisis de ácidos micólicos en muestras directas y el análisis de ácidos micólicos en cultivos jóvenes con la detección de micobacterias en los cultivos en Lowenstein-Jensen.



## CAPÍTULO 2

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 2.1 Área de Trabajo y Equipo

La parte experimental de este trabajo fue realizada en dos áreas separadas, dependiendo del proceso que se llevó a cabo. La parte correspondiente a la recepción de la muestra, digestión y descontaminación, baciloscopías, cultivo en Lowenstein-Jensen y pruebas bioquímicas fue realizada en las instalaciones del Laboratorio Estatal de los Servicios de Salud de Nuevo León en el área destinada a micobacterias. El cultivo joven en medio Middlebrook 7H9, la inactivación de estos cultivos, el análisis de ácidos micólicos de muestras directas, de cultivos jóvenes y de cepas aisladas fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Micobacterias del Centro Regional para el Control de las Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Medicina, U.A.N.L. y en el Laboratorio de Química Biomolecular de la misma Facultad.

En todos los procesos fueron utilizados los siguientes aparatos: campana de Bioseguridad Clase II Purifier Class (Labconco), centrífuga refrigerada (IEC Centra Modelo GP8R), microscopio compuesto (Carl Zeiss Modelo K-7), incubadora 37°C (Felisa), incubadora 37°C (Riossa), incubadora de CO<sub>2</sub> 37°C (Napco Modelo 4100), baño de temperatura (Riossa), autoclave (Ohio), autoclave (Market Forge Modelo Sterilmatic), balanza analítica (Sartorius Modelo AC120S), agitador tipo vortex (Fisher Scientific Modelo 231), coagulador eléctrico de 92°C (J.M. Ortiz Modelo C-69),

incubadora de CO<sub>2</sub>, 37°C (American-Scientific Products Modelo CI-46), campana de Bioseguridad Clase II Total Exhaust (Labconco), baño de agua (Precision Modelo 181), centrífuga para tubos eppendorf (Hermile modelo Z180MI), cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Beckman), columna Nova Pack de fase reversa C-18 150 x 4.6 mm (Waters Corporation), detector de fluorescencia (Beckman modelo 157), bloque de calentamiento (Thermolyne Modelo 17600), campana de humos (Lux), balanza analítica (Mettler Modelo AE163), balanza granataria (Sartorius Modelo PT 600), agitador tipo vortex (Scientific Products Modelo SP), autoclave (Presto modelo 21L), agitador orbital (Thermolyne modelo Rotomix) y equipo de cómputo (Compaq Modelo Presario 2253). También se utilizó el siguiente material: tubos de centrifuga de 50 y 15 mL (Corning y Falcon), tubos de ensaye de 16 x 150, de 13 x 100, de 15 x 100 (Pirex), pipetas lineales de 1 y 10 mL desechable, pipetas lineales de 10 y 15 mL, pipetas automáticas de 20-1000 µL (Biopette y Gilson), puntillas azules y amarillas (Axigen Scientific), tubos eppendorf de 2 y 0.5 mL (Axigen Scientific), pipetas Pasteur, bulbo insuflador de hule para pipetas Pasteur, gradillas para tubos de ensaye, termómetro químico de mercurio (Brannan), gasa, algodón, guantes, cubrebocas, respirador N95 (Survivor), lentes de seguridad, aplicadores, jeringa para inyección cromatográfica (Hamilton).

## 2.2 Material biológico

Se trabajó con 154 muestras de expectoración de personas con sospecha de tuberculosis o que se encontraban bajo control de la enfermedad, que se remitieron al Laboratorio Estatal de Salud Publica S.S.N.L. Las muestras de expectoración estudiadas tuvieron las siguientes características: de 3 a 5 mL; espesa y mucoide; algunas fueron fluidas con pedazos de tejido muerto; de color opaco blanco a verde; las muestras

sanguinolentas fueron rojizas o de color café, fueron provenientes del árbol bronquial, obtenidas después de un esfuerzo de tos y no de las que se obtienen de faringe o por aspiración de secreciones nasales o saliva, se colocaron en envase adecuado de boca ancha y con tapa de rosca, estuvieron bien identificadas, se conservaron y transportaron adecuadamente.

### 2.3 Estrategia general

Se recolectaron las muestras de expectoración remitidas al Laboratorio Estatal de Salud Pública S.S.N.L. y primeramente se sometieron a un proceso de digestión y descontaminación utilizando la técnica de Petroff (4). Una vez descontaminada la muestra se separó en cuatro fracciones que se destinaron a baciloscopía por tinción de Zhiel-Neelsen, análisis directo de ácidos micólicos, un cultivo joven en caldo Middlebrook 7H9 y un cultivo normal en medio L-J. La fracción para baciloscopía se extendió y se fijó sobre un portaobjeto y posteriormente se tiñó por la técnica de Ziehl-Neelsen. Las baciloscopías teñidas se examinaron, evaluaron y reportaron utilizando el criterio de cruces (4). La fracción destinada para el análisis directo de ácidos micólicos, se saponificó y se continuó con el tratamiento de extracción, derivatización y análisis cromatográfico de ácidos micólicos (11, 24). La fracción destinada al cultivo joven se inoculó sobre medio líquido Middlebrook 7H9 y al quinto o décimo día de incubación se inactivó, se centrifugó y se saponificó, posteriormente se realizó la extracción, derivatización y análisis cromatográfico de ácidos micólicos (11, 24). Por último, la fracción destinada al cultivo normal se inoculó sobre medio L-J y se observó su crecimiento hasta la novena semana. Se realizaron las pruebas bioquímicas convencionales de los cultivos positivos para la identificación de la especie (4). Además,

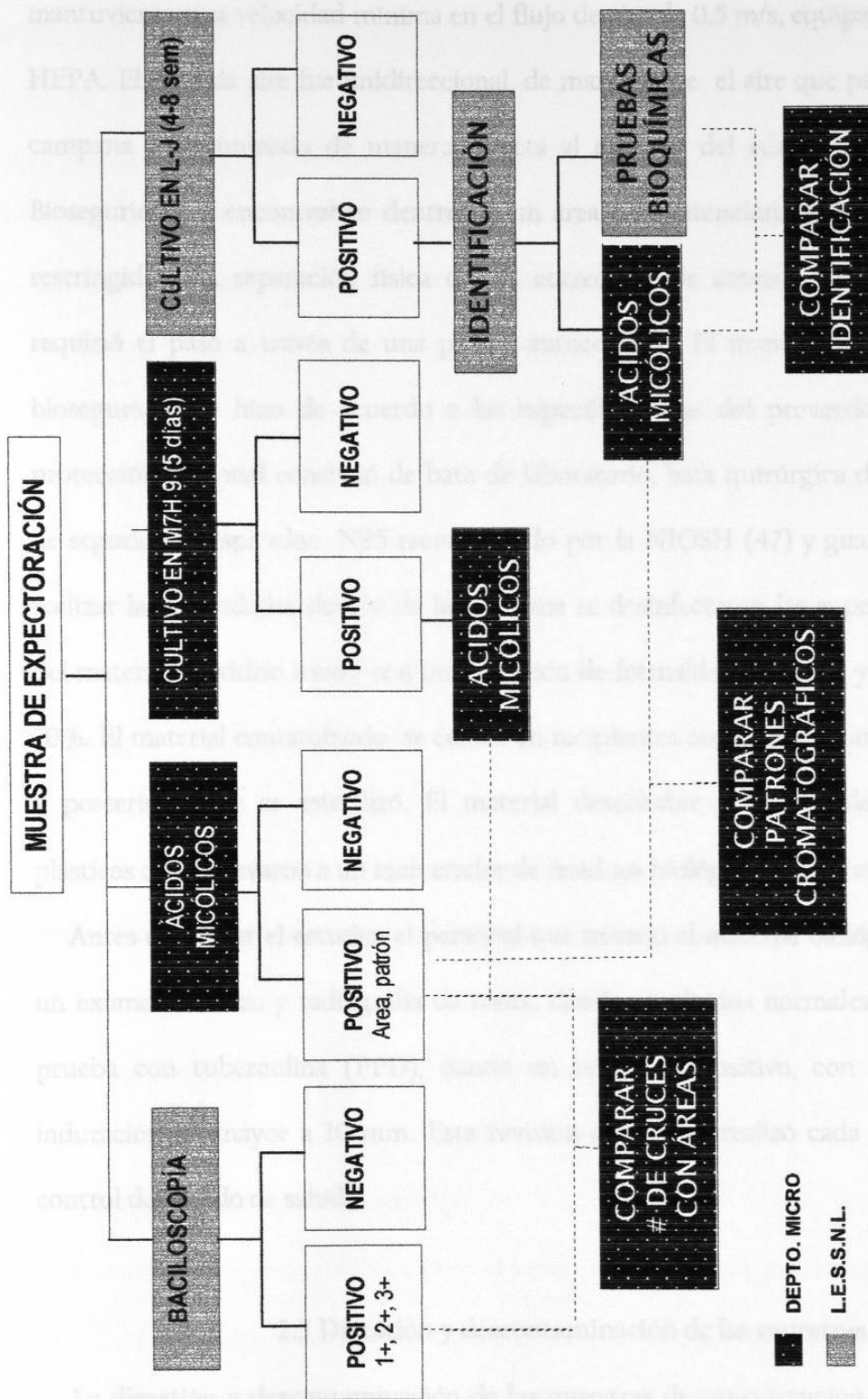
a los cultivos en L-J que resultaron positivos, se les realizó la extracción, derivatización y el análisis cromatográfico de ácidos micólicos (11, 24).

En aquellas muestras directas y/o cultivos jóvenes que mostraron señal cromatográfica, se determinó la especie de acuerdo al patrón cromatográfico de los ácidos micólicos y se calculó el área total de los picos identificados como ácidos micólicos (ATAM).

Una vez obtenidos los valores de ATAM de las muestras directas y de los cultivos jóvenes, se clasificaron en 5 grupos según el número de cruces de la baciloscopía de la misma muestra, se determinó el intervalo de ATAM de estos grupos y se compararon mediante una prueba ANOVA; en el caso donde se estableció una diferencia significativa se llevó a cabo una prueba de Tukey. Los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de las muestras directas y de los cultivos jóvenes se compararon con los correspondientes de sus cultivos positivos a través de las alturas relativas de los picos. La identificación de la especie de los cultivos en L-J realizada por pruebas bioquímicas se comparó con la realizada por el patrón cromatográfico de ácidos micólicos de estos cultivos. Los resultados de la baciloscopía, el análisis de ácidos micólicos en muestras directas y el análisis de ácidos micólicos en cultivos jóvenes se compararon con los obtenidos en el cultivo normal en L-J obteniendo el porcentaje de concordancia, el porcentaje de falsos negativos del cultivo, el porcentaje de los falsos negativos de la prueba a evaluar y el porcentaje de detección de la prueba (Fig. 5).

## 2.4 Medidas de Bioseguridad

La manipulación de muestras biológicas, cultivos y otros procedimientos que involucraron la producción de aerosoles se manejaron en el nivel de Bioseguridad II (4,



**Fig. 5.** Estrategia general del presente trabajo. Los recuadros con relleno oscuro indican los análisis que fueron llevados a cabo en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, U.A.N.L., y los que tienen relleno gris pertenecen a los exámenes realizados en el Laboratorio Estatal de los Servicios de Salud de Nuevo León. L-J Lowenstein-Jensen, M7H9 Middlebrook 7H9.

12, 14, 15). Se utilizaron campanas de Bioseguridad Clase II de flujo laminar vertical que mantuvieron una velocidad mínima en el flujo de aire de 0.5 m/s, equipadas con un filtro HEPA. El flujo de aire fue unidireccional, de manera que el aire que pasó a través de la campana fue eliminado de manera directa al exterior del edificio. Las campanas de Bioseguridad se encontraban dentro de un área de contención aislada, de circulación restringida, con separación física de los corredores de acceso; el acceso a esta área requirió el paso a través de una puerta autocerrable. El manejo de las campanas de bioseguridad se hizo de acuerdo a las especificaciones del proveedor. El equipo de protección personal consistió de bata de laboratorio, bata quirúrgica desechable, lentes de seguridad, respirador N95 recomendado por la NIOSH (47) y guantes. Después de realizar las actividades dentro de la campana se desinfectaron las superficies expuestas del material de vidrio usado con una solución de formaldehído al 5% y alcohol etílico al 70%. El material contaminado se colocó en recipientes conteniendo formaldehído al 5% y posteriormente se esterilizó. El material desechable usado, se desecho en bolsas plásticas que se llevaron a un incinerador de residuos biológico-infecciosos.

Antes de iniciar el estudio, el personal que manejó el material biológico se sometió a un examen médico y radiografía de tórax, dando resultados normales, así como a una prueba con tuberculina (PPD), dando un resultado positivo, con una reacción de induración no mayor a 10 mm. Esta revisión médica se realizó cada seis meses como control del estado de salud.

## **2.5 Digestión y descontaminación de las muestras**

La digestión y descontaminación de las muestras de expectoración por la técnica de Petroff (4) se llevó a cabo en el interior de una campana de Bioseguridad. Se colocaron

en una gradilla tubos cónicos estériles de 50 mL identificados de la misma manera que los recipientes que contenían la muestra, a cada uno de estos se agregaron de 2-10 mL de la muestra usando pipetas Pasteur grandes (con 3 mm de diámetro aproximado de la punta y 280 mm de longitud), provistas de un pipeteador semiautomático ('propipeta') de caucho. A cada tubo con muestra se le agregó un volumen igual de NaOH al 4% conteniendo rojo de fenol y se ajustó firmemente la tapa del tubo, esto para prevenir la formación de aerosoles al agitarlos más tarde. Los tubos se agitaron en un agitador mecánico tipo vortex 20 segundos antes de incubar a 37°C durante 15 minutos. Posterior a la incubación se centrifugó a 3 000 g (3 500 rpm) en una centrifuga refrigerada, durante 15 minutos (durante este proceso en el que se produjeron aerosoles se cuidó en forma especial el cierre hermético de los tubos y de la centrifuga), se eliminó cuidadosamente el sobrenadante en un dispositivo a prueba de salpicaduras que contenía fenol al 5%. El sedimento obtenido se neutralizó con ácido clorhídrico 1 N antes de sembrar en los medios de cultivo L-J y Middlebrook 7H9. El proceso de neutralización fue muy cuidadoso de manera que el pH no fuera menor de 6.5 ni mayor de 7.2, esto se corroboró observando que el sedimento obtenido fuera incoloro o de color amarillo paja.

## 2.6 Cultivo en Lowenstein-Jensen

### 2.6.1 Procedimiento para la siembra

El cultivo en L-J se llevó a cabo en el interior de una campana de seguridad biológica, donde se colocaron un par de gradillas, una con los tubos de los sedimentos y otra con los tubos del medio de cultivo identificados con el número correspondiente. Con una pipeta Pasteur estéril se tomaron dos o tres gotas del sedimento y se colocaron en una

laminilla identificada con su número correspondiente para realizar un frotis y posterior tinción por la coloración de Ziehl-Neelsen (ver punto 2.7), también se tomaron 2 gotas para realizar la siembra en los tubos del medio L-J, dejando escurrir sobre la superficie del medio sin tocarlo. Para cada muestra se sembró en dos tubos de medio L-J. La técnica de siembra fue meticulosa para la seguridad del operador, para no confundir las muestras y evitar la contaminación con gérmenes del ambiente. Una vez realizada la siembra los tubos se colocaron en posición inclinada, de modo que el sedimento colocado cubriera toda la superficie del medio, se llevaron a incubación a 37°C con la tapa floja para que se evaporara la parte líquida de la muestra.

#### 2.6.2 Evaluación del crecimiento en L-J

Los cultivos se examinaron por primera vez a las 48 horas de realizada la siembra, con el objeto de verificar que la parte líquida de la muestra se hubiera evaporado completamente, y para saber si alguno estaba contaminado o alterado por la mala neutralización de la muestra. Las tapas se ajustaron firmemente para impedir la desecación del medio durante el tiempo de incubación. El cultivo se consideró alcalinizado si el medio adquirió un color blanco amarillento y acidificado si tomó un color verde azulado oscuro. El desarrollo de colonias en los tubos de cultivo a las 48 horas de incubación se consideró contaminación por flora secundaria. Los cultivos se observaron posteriormente a los 7, 30 y 63 días y se tomaron los registros de los que fueron positivos. Se consideraron como cultivos negativos aquellos que después de un período de incubación de 63 días (9 semanas) no presentaron el desarrollo de colonias visibles. La evaluación del cultivo fue cualitativa y semicuantitativa, para lo cual se empleó la siguiente escala: negativo si no se observaron colonias, positivo 1 a 19 si el



número total de colonias en los tubos sembrados fue menos de 20, positivo (+) con la presencia de 20 a 100 colonias, positivo (++) si las colonias separadas fueron más de 100, positivo (+++) si se observaron colonias confluentes y contaminado si el cultivo resultó contaminado.

### 2.6.3 Identificación de micobacterias

La identificación de especie de las micobacterias se llevó a cabo en dos niveles de diferenciación que incluyen diversas pruebas morfológicas y bioquímicas:

#### 2.6.3.1 Primer nivel de diferenciación

En este nivel se incluyeron pruebas fundamentales que orientaron con gran certeza sobre la especie de micobacteria que se aisló, como son: morfología de las colonias, afinidad tintorial, morfología de los bacilos, velocidad de desarrollo, pigmentación y producción de niacina.

##### Morfología de las colonias

El examen morfológico de las colonias crecidas en el medio de L-J se realizó determinando visualmente el tamaño, consistencia, textura y color de las colonias.

##### Afinidad tintorial y morfología de los bacilos

La afinidad tintorial y la morfología de los bacilos se determinó en los cultivos en que hubo desarrollo de colonias sugerentes de ser micobacterias, se realizó un extendido sobre un portaobjetos al que se agregó una gota de agua destilada. Se fijó con calor y se tiñó con la técnica de Ziehl-Neelsen. Se observó al microscopio para comprobar la

presencia de BAAR y se registraron los siguientes datos: morfología, tamaño y formación de cordones.

#### Velocidad de desarrollo y pigmentación de las colonias

La velocidad de desarrollo y la pigmentación de las colonias se realizó preparando una suspensión de bacilos y se ajustó su turbidez con la del tubo 1 del nefelómetro de McFarland. A partir de esta suspensión se hicieron diluciones decimales  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ . Con la dilución  $10^{-2}$  se sembraron 4 tubos con medio de cultivo y se incubaron en las siguientes condiciones: un tubo con medio de L-J a 20-25°C (temperatura ambiente), otro tubo con medio de L-J a 42°C y dos tubos más con medio de L-J a 37°C, de los cuales uno se envolvió muy bien con papel de aluminio o papel negro y se incubó a 37°C. Los tubos se examinaron a los 7, 15, 30 y 60 días. Se registró el día de la aparición de colonias, su aspecto, la presencia de pigmento y las temperaturas a las cuales hubo desarrollo. Cuando el crecimiento fue suficiente (28-30 días) se procedió a registrar su fotocromogenicidad. Si se observó pigmentación en los dos tubos incubados a 37°C, el cubierto y el no cubierto, se reportó como una micobacteria escotocromógena. Cuando no se observó pigmentación en ninguno de estos tubos o ésta fue ligera en los tubos sin cubrir, se efectuó la prueba de fotocromogenicidad en la forma siguiente: los dos cultivo incubados a 37°C, el cubierto y el descubierto, se expusieron a la luz de una lámpara de 50 watt a 50 cm de distancia durante una hora y se incubó nuevamente hasta el día siguiente y se comparó la coloración de ambos tubos. Si se observó aparición de pigmento en ambos, la cepa fue fotocromógena. Si no había pigmentación en cualquiera de los dos tubos, la cepa no fue cromógena.

### Producción de niacina

La prueba para la producción de niacina se realizó tomando un tubo del cultivo problema con abundantes colonias de no menos de 4 semanas de desarrollo y se le agregó 1 mL de agua destilada estéril, simultáneamente se dispusieron los testigos siguientes: el positivo a partir de un cultivo conocido de *M. tuberculosis* y el negativo con medio solo. El medio se rompió con el asa a fin de facilitar la difusión de la niacina. Cada tubo se dejó inclinado durante 15 minutos, se colocó nuevamente en posición vertical, se extrajo el líquido con una pipeta provista de propipeta, se pasó a un tubo limpio y se agregaron 0.5 mL de una solución de bromuro de cianógeno y 0.5 mL de una solución de anilina. La presencia de una coloración amarilla significó la presencia de niacina. Para evitar que el bromuro de cianógeno en presencia de ácido se convirtiera en ácido cianhídrico, se agregó una solución de NaOH a cada uno de los cultivos al finalizar la prueba.

### 2.6.3.2 Segundo nivel de diferenciación de micobacterias

Para determinar un segundo nivel de diferenciación de las micobacterias se realizaron, además de las pruebas ya descritas, las que se describen a continuación: reducción de nitratos, actividad de catalasa a temperatura ambiente y a 68°C e hidrólisis de Tween 80.

#### Reducción de nitratos

En tubos de 16 x 125 mm con tapa de rosca se colocaron de 3 a 4 gotas de agua destilada, se introdujo una asa bien cargada de bacilos y se homogeneizó bien cada suspensión. Posteriormente se agregaron 2 mL del sustrato amortiguador para nitratos,

se agitaron e incubaron a 37°C durante dos horas. Después de la incubación se les agregó una gota de HCl 1:1, vol/vol, dos gotas de sulfanilamida al 2% y dos gotas de clorhidrato de N-Naftiletildiamina al 0.1% y se agitaron manualmente. Como testigo positivo se usó un cultivo de *M. tuberculosis* y como negativo solo reactivos. El desarrollo de un color rojo indicó que la prueba fue positiva, comparando el color con el tubo del testigo negativo.

#### Actividad de la catalasa a temperatura ambiente y a 68°C

La prueba de actividad de la catalasa se realizó distribuyendo en tubos de 12 x 100 mm 0.5 mL de una solución amortiguadora pH 7 en cada tubo empleando dos tubos para cada cepa. A cada uno de los tubos se les agregó el contenido de una asa cargada de colonias, se dejó uno a temperatura ambiente y el otro se colocó en baño María a 68°C durante 20 min, este último se retiró y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Por otro lado se preparó una mezcla en partes iguales de una solución de Tween 80 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se agregaron 0.5 mL de este reactivo a cada tubo. Esta mezcla fue preparada en el momento de ser usada. Los testigos se hicieron por duplicado utilizando una serie de tubos a temperatura ambiente y la otra a 68°C. Como testigo positivo se utilizó *M. tuberculosis* (positivo a temperatura ambiente y negativa a 68°C), *M. fortuitum* o *M. phlei* (positivo a temperatura ambiente y a 37°C) y como control negativo se utilizaron solo reactivos. La formación de burbujas en la superficie se consideró como resultado positivo, dejándolos en observación 20 minutos antes de registrar un resultado como negativo.

#### Prueba de hidrólisis de Tween 80 (Wayne)

La prueba de hidrólisis de Tween 80 se realizó inoculando un tubo de sustrato (Tween al 10% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en partes iguales) con un asa cargada de bacterias, éste se

incubó a 37°C sin exponer a la luz y se examinó a los 5 y a los 10 días, comparando con el control ámbar. Se consideró un resultado como positivo cuando se observó un cambio de color a rosa salmón. Como testigo positivo se utilizó *M. kansasii* y como negativo solo reactivos. En el apéndice B se describen los resultados de todas estas pruebas para la correcta identificación de *M. tuberculosis*.

#### 2.6.4 Tratamiento para el análisis de ácidos micólicos

Una vez aislada la cepa, se llevó a cabo el tratamiento para el análisis de ácidos micólicos como sigue: en el interior de una campana de seguridad biológica se colocaron los tubos con las cepas aisladas, se tomó con un aplicador una pequeña cantidad de biomasa y se colocó en otro tubo con tapón de rosca al cual se le había agregado previamente 1 mL de KOH al 25%. Se cerró perfectamente el tubo conteniendo la cepa y la suspensión en KOH. Después de desinfectar el área se llevó la suspensión de micobacterias en KOH a un autoclave a 121°C por 1 hora a 15 lb de presión para llevar a cabo la saponificación. El producto de la saponificación contenido en los tubos se reservó para la posterior extracción y derivatización de ácidos micólicos como se describe más adelante.

### 2.7 Baciloscopia

#### 2.7.1 Preparación del extendido

El frotis preparado a partir de la muestra digerida y descontaminada (ver sección 2.5), se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó sobre una plancha de calentamiento hasta sequedad teniendo cuidado de no producir aerosoles. El material usado se

esterilizó y el área de trabajo se desinfectó con formaldehído o fenol al 5%. Los frotis fijados se tñeron como se describe a continuación:

### 2.7.2 Tinción del extendido

La tinción de las baciloscopías se llevó a cabo utilizando la técnica Ziehl-Neelsen (4) colocando los frotis sobre varillas de vidrio dispuestas en un lavamanos o sobre una cubeta o bandeja metálica de coloración, con el extendido hacia arriba y conservando el orden numérico. Se cubrió la superficie del extendido con fucsina fenicada previamente filtrada, se calentó suavemente por debajo de las láminas cubiertas con fucsina utilizando la llama de un hisopo de algodón humedecido en alcohol hasta que se produjo emisión de vapores blanquecinos visibles; se dejó de calentar y se repitió la operación por dos veces más. Después de 5 minutos, se eliminó la fucsina lavando los portaobjetos con agua a baja presión. Para la decoloración se cubrió el extendido con alcohol-ácido, se tomó la lámina por los bordes del extremo numerado y se efectuó un suave movimiento de vaivén, de modo que el alcohol-ácido fuera decolorando y arrastrando la fucsina. Cuando la solución decolorante adquirió una coloración roja se lavó con agua, para eliminar el alcohol-ácido. Esta operación tardó alrededor de uno a dos minutos. Una vez que se decoloró, se procedió a la coloración de contraste para lo cual se cubrió la superficie del extendido con azul de metileno durante un minuto. Se eliminó el azul de metileno y el portaobjetos se lavó con agua a baja presión, tanto por la superficie del extendido como por su cara inferior. Las láminas ya teñidas se secaron a temperatura ambiente, colocándolas verticalmente sobre papel absorbente limpio.

### 2.7.3 Observación microscópica

Se empleó un microscopio equipado con objetivo de inmersión (100X) y ocular de 8X o de 10X. Con un cuentagotas se colocó una gota de aceite de inmersión sobre el extremo más cercano a la numeración del extendido, se enfocó el microscopio acercando el objetivo de inmersión hasta tocar la superficie de la gota de aceite ajustando enseguida con el tornillo micrométrico. Cada campo microscópico se dividió mentalmente en cuatro cuadrantes como la esfera de un reloj. La lectura se inició en el superior derecho y se continuó con los otros en el sentido de las manecillas del reloj. Se observó en superficie y en profundidad, utilizando constantemente el tornillo micrométrico. La identificación positiva de bacilos se estableció si se observaron o no bacilos ácido-alcohol resistentes en el extendido y si los había, el número promedio aproximado por campo microscópico. Los bacilos se observaron como bastoncillos delgados, ligeramente curvos, teñidos de rojo sobre el azul claro de la tinción de contraste. Se siguió una pauta sistemática para la observación, leyendo de izquierda a derecha del extendido un mínimo de 100 campos útiles (Fig. 6).

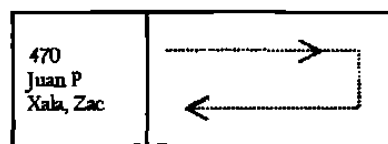


Fig. 6. Recorrido para efectuar la lectura por cien campos microscópicos

Se consideró campo microscópico útil aquel en el que se observaron elementos celulares de origen bronquial (leucocitos, fibras y células ciliadas). Los campos en los que no aparecieron dichos elementos no se contabilizaron en la lectura. El número de campos a observar fue variable según la cantidad de bacilos: si no se encontraron BAAR o había menos de un bacilo por campo en promedio, se examinaron al menos 100 campos

microscópicos útiles; si se encontraron de 1 a 10 bacilos por campo en promedio, fue suficiente la observación de 50 campos; si se encontraron más de 10 bacilos por campo en promedio, bastó con la observación de 20 campos. Terminada la lectura se limpió el aceite de inmersión del objetivo con papel suave o gasa, absorbiendo el aceite sin frotar la superficie del lente. El frotis observado se sumergió en xilol, se escurrió para eliminar el aceite y se archivó.

#### 2.7.4 Evaluación de los resultados

El criterio usado para la clasificación de las baciloscopias fue el siguiente: se consideró baciloscopía negativa (-) si no se encontraron bacilos ácido-alcohol resistentes en 100 campos observados, positiva si se observaron de uno a nueve bacilos en los 100 campos observados, positivo 1+ si se encontró menos de un bacilo por campo en promedio en 100 campos observados, positivo 2+ si se observaron de uno a diez bacilos por campo en promedio, en 50 campos observados y positivo 3+ cuando se encontraron más de diez bacilos por campo en promedio, en 20 campos observados.

### 2.8 Cultivo en Medio Middlebrook 7H9

#### 2.8.1 Procedimiento para la siembra

La inoculación de la muestra en medio Middlebrook se llevó a cabo en el interior de la campana de seguridad biológica colocando un par de gradillas, una conteniendo los tubos de 15 x 150 cada uno con 1 mL del medio de cultivo Middlebrook 7H9 (al cual se le adicionó previamente un suplemento de enriquecimiento OADC y un suplemento antibiótico PANTA) y otra que contenía los tubos de centrifuga con las muestras de esputo descontaminadas. A los tubos conteniendo el medio líquido se añadieron 3 gotas



de la suspensión descontaminada de la muestra de expectoración utilizando una pipeta Pasteur estéril, y se cerraron perfectamente. El resto de la muestra de expectoración se designó para el análisis de ácidos micólicos en muestras directas que se describe más adelante. Después de llevar a cabo la esterilización del área, los tubos conteniendo el medio inoculado se colocaron en una incubadora a 37°C, con la tapa floja, en posición inclinada y agitación constante (aproximadamente a 100 rpm) por espacio de 5 ó 10 días. Una vez concluido este tiempo, se sacaron los tubos de la incubadora y se les realizó un tratamiento de inactivación que a continuación se describe.

### 2.8.2 Inactivación del cultivo y saponificación

El tubo con tapón de rosca conteniendo el cultivo en medio Middlebrook 7H9 se sumergió en un baño de agua a 80°C por espacio de 1 hora para lograr la inactivación de las micobacterias, asegurándose de cerrar perfectamente la tapa. Después de la inactivación del cultivo, se llevó a cabo una centrifugación por 10 minutos a 5 000 rpm en una centrífuga Servall Superspeed. Se descartó el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur, y la pastilla bacteriana se resuspendió en 1 mL de KOH al 25%. La suspensión del cultivo se llevó a autoclave por 1 hora a 121°C y 15 lb de presión para llevar a cabo la saponificación. El contenido de los tubos se reservó para realizar la posterior extracción y derivatización de ácidos micólicos (Ver 2.10).

## 2.9 Muestra directa

### 2.9.1 Inactivación y saponificación

La inactivación y saponificación de la muestra directa se realizó en el interior de la campana de seguridad biológica colocando en una gradilla los tubos de centrifuga de 50

mL con la muestra de esputo digerida y descontaminada. Después de tomar el inóculo para el cultivo joven, se agregó a la muestra de esputo 1 mL de KOH al 75%, utilizando una pipeta lineal. Después de llevar a cabo la esterilización del área, se llevó el tubo de centrifuga conteniendo la suspensión de la muestra de esputo, a la autoclave a 121°C y 15 lb de presión para llevar a cabo la saponificación. El contenido de los tubos se reservó para realizar la posterior extracción y derivatización de ácidos micólicos (Ver punto 2.10).

### 2.10 Extracción y derivatización de ácidos micólicos

El producto saponificado de la muestra directa, del cultivo joven y del cultivo en L-J, se acidificó con 1 mL de HCl 6 N y se añadió 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El tubo con su contenido se tapó perfectamente, se mezcló vigorosamente utilizando para este fin un agitador tipo vortex. Posterior a la agitación, los tubos se dejaron en reposo para permitir la formación de dos fases líquidas y se removió la fase del fondo con una pipeta Pasteur. Los ácidos micólicos se extrajeron dos veces más con 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> repitiendo el paso anterior. El pH del residuo acuoso se verificó con indicador rojo congo acuoso al 1% para pH ácido (azul). Si no se observó el viraje, se añadieron unas gotas de HCl 6N hasta acidificación y se realizaron tres extracciones sucesivas con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los extractos orgánicos se recolectaron en un tubo con tapón de rosca y se evaporó a sequedad en un bloque de calentamiento a 60°C. Al extracto seco de ácidos micólicos se añadió 0.1 mL de KHCO<sub>3</sub> 0.2 M y se evaporó a sequedad a 90°C en un bloque de calentamiento bajo una corriente de nitrógeno. El contenido del tubo se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 0.5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y 100 µL de una mezcla de 1.25 mg/mL de 4-bromometil-6,7-dimetoxicumarina y 0.15 mg/mL de éter 18-corona-6 en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (reactivo de

derivatización). Se tapó el tubo perfectamente, se mezcló su contenido en un vortex por 30 segundos y se calentó a 90°C por 20 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, al producto de la reacción de derivatización se le añadió 1 mL de HCl 12 N-metanol-agua (1:2:1), se mezcló perfectamente y se removió la fase orgánica del fondo con una pipeta Pasteur. Los derivados fluorescentes de AM se extrajeron de la fase acuosa con 0.7 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en 2 extracciones consecutivas. Los extractos orgánicos se recolectaron en un tubo eppendorf y se evaporó a sequedad calentando a 40°C sobre un bloque térmico. Una vez obtenido el residuo seco se llevó a cabo el análisis cromatográfico de los derivados fluorescentes de los AM extraídos. El residuo seco se guardó en refrigeración, tapando perfectamente el tubo eppendorf para posterior análisis cromatográfico.

## 2.11 Análisis cromatográfico de los ácidos micólicos

Para llevar a cabo del análisis cromatográfico de los derivados fluorescentes de los AM se utilizó el residuo seco obtenido en el paso anterior, el cual se disolvió en 80 µL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> frío (<-10°C), se centrifugó la mezcla a 16000 x g (14000 rpm) en una microcentrífuga por 3 segundos y se inyectó inmediatamente, en un volumen por lo menos 3 veces el volumen del loop, al cromatógrafo de líquidos (60 µL). Se utilizó un gradiente de elución metanol-cloruro de metileno a un flujo de 2.5 mL/min con una condición inicial de solvente de 98% de metanol 2% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la concentración de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se incrementó linealmente a 20% en 1 minuto, a 65% en 10 minutos, a 95% en 5 minutos y decreció linealmente a 2% en 10 minutos. Para cada cromatograma, se determinó el ATAM en el tiempo de retención entre 7 y 10 min.

### 2.11.1 Criterios para detectar la presencia de ácidos micólicos

Para detectar la presencia de ácidos micólicos se siguieron los siguientes criterios: presencia de picos entre 7.4 y 9.9 min y que el pico más alto entre 7.4-9.9 min fuera 2 veces más alto que el promedio de la altura de los 4 picos ubicados antes del intervalo de 7.4-9.9 min (Fig. 7).

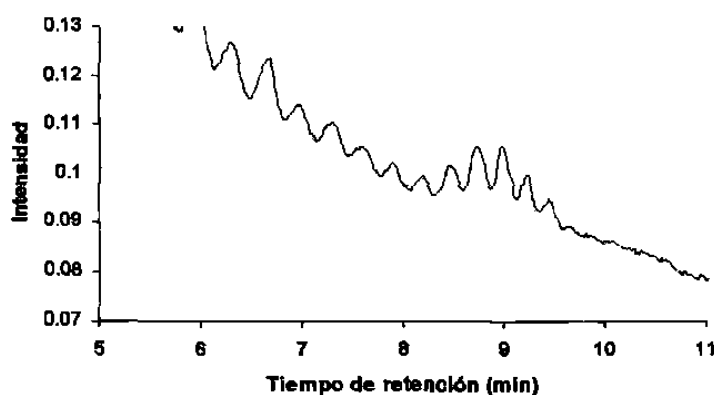


Fig. 7. Patrón cromatográfico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de *M. tuberculosis* en muestras directas de expectoración.

### 2.11.2 Criterios para la identificación de *M. tuberculosis* por CLAR.

Para la identificación de *M. tuberculosis* por CLAR se siguieron los siguientes criterios: patrón característico y visiblemente similar con el reportado en la bibliografía. Además que la relación de las alturas de los picos del intervalo de 7.4 y 9.9 min entre la suma de las alturas de todos los picos del mismo intervalo estuviera dentro del intervalo de dos desviaciones estándar establecido con cinco análisis de ácidos micólicos realizados en días diferentes de una cepa testigo de *M. tuberculosis* H37RA y cuatro aislamientos clínicos identificados correctamente por pruebas bioquímicas como *M. tuberculosis* (Fig. 8

y Apéndice B). Se obtuvieron los porcentajes de las muestras identificadas como *M. tuberculosis* y las identificadas como no *M. tuberculosis*.

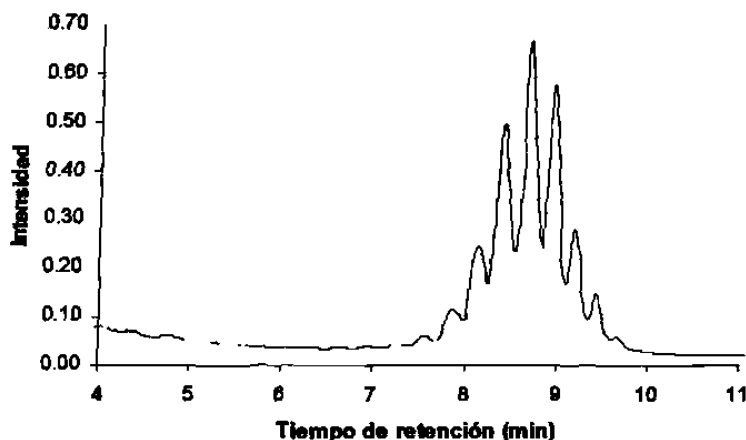


Fig. 8. Patrón cromatográfico característico de derivados fluorescentes de ácidos micólicos de *M. tuberculosis*.

## 2.12 Comparación de los resultados de las baciloscopías vs el ATAM de las muestras directas y el cultivo joven

Los valores obtenidos de ATAM de las muestras directas y de los cultivos jóvenes se clasificaron en 5 grupos según el número de cruces de la baciloscopía de la misma muestra. Se determinó el intervalo de ATAM de estos grupos y se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA); esto para establecer una diferencia significativa entre ellos y ver si era posible, en base al ATAM, predecir el número de cruces de la baciloscopía en las muestras. En el caso donde se establecieron diferencias significativas se llevó a cabo una prueba de comparaciones múltiples de Tukey con la finalidad de saber qué grupos presentaban esta diferencia. Ambas pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa computacional SPSS 8.0.

### **2.13 Comparación de los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de las muestras directas y sus correspondientes CJ y cultivos en L-J positivos**

Los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de las muestras directas y de los cultivos jóvenes se compararon con los correspondientes de sus cultivos positivos en L-J por superposición visual de los mismos y utilizando el criterio de identificación de *M. tuberculosis* por CLAR mencionado en el punto 2.11.2. Se obtuvo el porcentaje de muestras que en su patrón cromatográfico de la muestra directa y del cultivo joven coincidieron con el obtenido en el cultivo en L-J.

### **2.14 Comparación de la identificación de especie en los cultivos en L-J por el análisis de AM y pruebas bioquímicas**

Se comparó la identificación de la especie de los cultivos en Lowenstein-Jensen, realizada por pruebas bioquímicas (2.7.3) y por el patrón cromatográfico de ácidos micólicos de estos cultivos (2.11.2). Se obtuvo el porcentaje de muestras que coincidieron en la identificación por ambos métodos, además se determinó el porcentaje de las identificadas como *M. tuberculosis* y las identificadas como no *M. tuberculosis*.

### **2.15 Comparación de la detección de micobacterias en las baciloscopías, en análisis de AM en muestras directas y en análisis de AM en CJ vs la detección de micobacterias en los cultivos en L-J**

Para comparar la detección de micobacterias en las baciloscopías, el análisis de ácidos micólicos en muestras directas y el análisis de ácidos micólicos en los cultivos jóvenes

con la detección en los cultivos en L-J, se calculó el porcentaje de concordancia entre las pruebas a evaluar y el cultivo en L-J, el porcentaje de falsos negativos del cultivo (FNC) tomando como muestras positivas las que dieron positivo en alguna de las dos pruebas, el porcentaje de falsos negativos de la prueba a evaluar (FNP) siguiendo el mismo criterio anterior, y el porcentaje de detección de la prueba a evaluar. Mediante el porcentaje de concordancia se obtiene la proporción de muestras que en su resultado positivo, concuerdan por ambos métodos. El porcentaje de falsos negativos del cultivo en L-J (FNC), indica el porcentaje de muestras positivas que no puede ser detectado por el cultivo en L-J, pero sí por la prueba a evaluar. El porcentaje de falsos negativos para la prueba a evaluar (FNB/AM) con respecto al cultivo en L-J, representa el porcentaje de muestras que no dan positiva la prueba a evaluar pero que sí son positivas en el cultivo en L-J. Para el cálculo de estos parámetros se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{Concordancia} = 100 \times \frac{a+d}{a+b+c+d}$$

$$\% \text{Falsos negativos del cultivo (FNC)} = 100 \times \frac{b}{a+b+c+d}$$

$$\% \text{Falsos negativos de la prueba a evaluar (FNP)} = 100 \times \frac{c}{a+b+c+d}$$

$$\% \text{Detección de la prueba} = 100 \times \frac{a+b}{a+b+c}$$

En donde a es el número de muestras que resultaron positivas tanto para la prueba a evaluar como para el cultivo en L-J, b es el número de muestras que fueron positivas para la prueba a evaluar pero negativas para el cultivo en L-J, c es el número de muestras que

resultaron negativas para la prueba a evaluar y positivas en el cultivo en L-J y d es el número de muestras que fueron negativas a ambas pruebas.

Por último se construyó una tabla comparativa para exponer los resultados de estos parámetros y de acuerdo a éstos se obtuvieron las conclusiones de este trabajo.



## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Resultados de la detección de micobacterias en las diversas pruebas realizadas

En el apéndice A se incluye un resumen de los resultados de todas las muestras analizadas, desde el número de registro en el laboratorio, la fecha de recolección de la muestra, la fecha de inicio del cultivo joven y en L-J, el ATAM en las muestras directas y los cultivos jóvenes, el nombre de la especie identificada en la muestra directa, en el cultivo joven y en el cultivo en L-J, y por último, como observación se especifica si el paciente estuvo bajo tratamiento antifímico al momento de la recolección de la muestra. Se procesaron en total 154 muestras de expectoración, de las cuales 101 (65.6%) mostraron un resultado positivo en la baciloscopia, 39 (25.3%) en el análisis de AM en muestras directas, 89 (57.8%) en el análisis de AM a cultivos jóvenes y 84 (54.5%) en el cultivo en L-J. A los 84 cultivos que resultaron con crecimiento en el medio L-J, se les realizaron las pruebas bioquímicas convencionales para la identificación de especie y el análisis de ácidos micólicos con el mismo fin.

El total de muestras de expectoración que resultaron positivas para el análisis de AM de manera directa, según el resultado de la baciloscopia, fue el siguiente: 0 (0%) de las 51 muestras clasificadas como negativas, 0 (0%) de las 8 clasificadas como positivas, 2 (9.5%) de las 21 clasificadas como 1+, 5 (17.2%) de las 29 clasificadas como 2+ y 32

(82.1%) de las 39 clasificadas como 3+. Las muestras en que se puede hacer la detección de AM en un alto porcentaje corresponde a las muestras clasificadas como 3+, es decir donde se encuentra un alto contenido de bacilos.

El total de muestras que resultaron positivas para el análisis de ácidos micólicos en cultivos jóvenes a 5 días, de acuerdo al resultado en el BAAR, fue de 0 (0%) de las 9 muestras clasificadas como negativas, 0 de las 3 clasificadas como positivas, 2 (22.2%) de las 9 clasificadas como 2+ y 5 (83.3%) de las 6 clasificadas como 3+. Para esta prueba no se incluyeron muestras de las clasificadas como 1+.

El total de muestras que resultaron positivas en el análisis de ácidos micólicos en cultivos jóvenes a 10 días, de acuerdo al resultado en el BAAR, fue el siguiente: 12 (27.9%) de las 43 muestras clasificadas como negativas, 2 (40.0%) de las 5 muestras clasificadas como positivas, 12 (57.1%) de las 21 muestras clasificadas como 1+, 23 (95.8%) de las 24 clasificadas como 2+ y 33 (100.0%) de las 33 clasificadas como 3+.

### 3.2 Comparación de los resultados de las baciloscopías vs el ATAM de las muestras directas y el cultivo joven

En la tabla I se muestran las medias y desviaciones estándar de los valores de ATAM en muestras directas y cultivos jóvenes clasificadas según el resultado de la baciloscopia.

Al realizar un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey entre las medias de los diferentes grupos, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los grupos de baciloscopia negativa, positiva, 1+ y 2+. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo de baciloscopia 3+ y los otros cuatro grupos tanto para las muestras directas como para los

cultivos jóvenes. Esto indica que en el grupo de baciloscopia 3+ se puede predecir el número de cruces de ésta con el valor del ATAM tanto en el análisis en muestra directa como en el cultivo joven.

**Tabla I. Valores de ATAM de muestras de expectoración y cultivos jóvenes a 10 días vs número de cruces de la baciloscopia.**

BAAR	n	ATAM MD	N	ATAM CJ
Negativo	51	43.91 ± 53.83 <sup>a</sup>	38	1.07 ± 1.83 <sup>a</sup>
Positivo	7	36.97 ± 36.97 <sup>a</sup>	5	0.66 ± 0.72 <sup>a</sup>
1+	21	54.74 ± 81.66 <sup>a</sup>	21	4.93 ± 8.07 <sup>a</sup>
2+	27	72.42 ± 123.98 <sup>a</sup>	22	19.88 ± 43.9 <sup>a</sup>
3+	35	226.05 ± 274.60 <sup>b</sup>	31	256.52 ± 397.4 <sup>b</sup>

BAAR: baciloscopias ácido-alcohol resistentes, n: número de muestras, ATAM: área total de los picos identificados como ácidos micólicos, MD: muestra directa, CJ: cultivo joven. Literales diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### 3.3 Comparación de los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de las muestras directas y sus correspondientes CJ y cultivos en L-J positivos

A las 84 muestras que tuvieron crecimiento sobre el medio L-J se les hizo un análisis de AM para obtener su patrón cromatográfico y posteriormente identificarlas. De estas muestras, 81 fueron identificadas como *M. tuberculosis* y 3 como no *M. tuberculosis*.

De las 39 muestras de expectoración a las que se les detectó la presencia de ácidos micólicos de manera directa, 34 (87.2%) fueron identificadas mediante el patrón

cromatográfico. De estas muestras 33 fueron identificadas como *M. tuberculosis* y 1 como no *M. tuberculosis*.

De las 89 muestras a las que se les detectó la presencia de ácidos micólicos en cultivos jóvenes, 70 (78.7%) pudieron ser identificadas mediante el patrón cromatográfico. En estas muestras 68 fueron identificadas como *M. tuberculosis* y 1 como no *M. tuberculosis*.

Aplicando el criterio para la identificación de especie a través del patrón de ácidos micólicos (ver 2.11.2), se encontró que 83 de 84 (98.8%) de los patrones cromatográficos de las muestras directas y cultivos jóvenes coincidieron con los correspondientes a los cultivos positivos en Lowenstein-Jensen. La única muestra que no coincidió en la identificación por el análisis de ácidos micólicos en la muestra directa y cultivo joven con el cultivo en L-J correspondió a una muestra que se identificó inicialmente en la muestra directa y el cultivo joven como *M. tuberculosis* y que posteriormente fue identificada como *M. kansasii* en el cultivo en L-J.

#### **3.4 Comparación de la identificación de especie en los cultivos en L-J por el análisis de AM y pruebas bioquímicas**

En los 84 cultivos que resultaron positivos en el medio Lowenstein-Jensen coincidió la identificación de la especie mediante el patrón cromatográfico de AM y las pruebas bioquímicas. Se identificaron 81 (96.4%) aislamientos clínicos como *Mycobacterium tuberculosis* y 3 (3.6%) como micobacterias no tuberculosas. Las tres especies identificadas como no *M. tuberculosis* fueron *M. simiae*, *M. gordonae* y *M. kansasii*.

### 3.5 Comparación de la detección de micobacterias en las baciloscopías, en análisis de AM en muestras directas y en análisis de AM en CJ vs la detección de micobacterias en los cultivos en L-J

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos de los porcentajes de concordancia entre las pruebas evaluadas y el cultivo en L-J, los porcentajes de los falsos negativos del cultivo en L-J, los porcentajes de falsos negativos y el porcentaje de detección de las pruebas evaluadas. Los resultados obtenidos para la prueba de AM en CJ de 10 días se dividieron además en aquellos realizados a pacientes con y sin tratamiento antifímico.

Tabla II. Comparación entre las distintas pruebas realizadas y el cultivo en L-J.

Prueba	n	% Concordancia <sup>a</sup>	% FNC	% FNB/AM <sup>b</sup>	% Detección <sup>b</sup>
BAAR	154	76.0	17.5	6.5	91.9
AM MD	148	60.1	6.1	33.8	43.8
AM CJ 5d	27	59.0	3.7	37.0	41.1
AM CJ 10d	127	76.4	17.3	6.3	91.1
AM CJ 10d CT	91	76.9	15.0	7.7	88.7
AM CJ 10d ST	36	75.0	22.0	2.8	96.4

BAAR: baciloscopías ácido-alcohol resistente, AM: ácidos micólicos, MD: muestra directa, CJ: cultivo joven, 5d: 5 días, 10d: 10 días, CT: pacientes con tratamiento previo, ST: pacientes sin tratamiento previo, n: número de muestras analizadas, FNC: falsos negativos del cultivo en L-J, FNB/AM: falsos negativos de la baciloscopia o del análisis de AM, a) con el cultivo en L-J, b) considerando como muestras positivas las que dieron positivo en alguna de las dos pruebas.

De las pruebas que se evaluaron, la detección de AM en CJ a 10 días en pacientes con tratamiento, fue la que tuvo mejor concordancia con el resultado obtenido en el cultivo en L-J. La detección de AM en el CJ a 10 días en pacientes sin tratamiento fue la prueba con el valor más bajo del porcentaje de falsos negativos de la baciloscopia y de los ácidos

micólicos (FNB/AM). Por último se obtuvo el porcentaje de detección de cada una de las pruebas, y aunque la baciloscopía mostró un valor superior a la detección de AM en la muestra directa y en los cultivos jóvenes a 5 días, en éstos además de la detección se logró obtener un alto porcentaje en la identificación de la especie en las muestras con una alta cantidad de bacilos. Nuevamente la detección de ácidos micólicos en cultivos jóvenes a 10 días resultó ser la prueba con un mayor porcentaje de detección de micobacterias y por lo tanto de las pruebas evaluadas la prueba de elección como apoyo en el diagnóstico de la tuberculosis.

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

El empleo de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para el análisis de ácidos micólicos permitió la evaluación de la detección de micobacterias en muestras de expectoración directas y en cultivos jóvenes. Este método se basa en la detección de lípidos micobacterianos característicos, componentes de la pared celular de las micobacterias.

Con este estudio se evaluó la aplicación de la CLAR a muestras clínicas directas, con el fin de obtener la identificación de género y especie en menos de 24 horas de llegada la muestra clínica al laboratorio. Los resultados indican que esta rápida identificación de género y especie solo es posible en muestras con una alta cantidad de bacilos, es decir en las muestras con baciloscopia 3+. Esto presenta una gran ventaja ya que los únicos métodos existentes que proporcionan estos resultados son los costosos métodos de amplificación de ácidos nucleicos, con la diferencia de que estos no permiten identificar una amplia variedad de especies micobacterianas.

El número de muestras que mostraron un resultado positivo en el cultivo joven en el medio Middlebrook 7H9 (57.8%) fue mayor que el que se obtuvo en el cultivo en L-J (54.5%); esto indica que el medio L-J no es la mejor alternativa para el aislamiento primario de micobacterias, tal como se ha reportado en la bibliografía (33); por lo tanto, es muy importante la implementación de otros medios de cultivo como el Middlebrook 7H10 o el Middlebrook 7H9 en los Laboratorios de Referencia de nuestro País.

La comparación del ATAM en muestras directas y cultivos jóvenes con el número de cruces se hizo en base al trabajo desarrollado por Garza-González *et al.* (26) donde se describe una relación exponencial entre el ATAM y la cantidad de microorganismos presentes en una muestra. Sin embargo, en este trabajo no fue posible establecer esta relación, ya que en las muestras directas se obtuvo un patrón cromatográfico que mostraba una señal oscilante desde el inicio del cromatograma (ver Fig. 7), debida probablemente a una interacción entre la matriz de la muestra y la columna. Esta señal fue de distinta intensidad en todas las muestras, así que al hacer el cálculo del ATAM promedio en el intervalo de 7.4-9.9 min también se tomó en cuenta el valor de la señal de ruido, de manera que los resultados no fueron uniformes. Por otro lado, sí se encontró una relación entre el ATAM y el resultado de baciloscopia 3+, probablemente porque en estas muestras la intensidad de la señal oscilante fue despreciable frente a la intensidad de los picos de los ácidos micólicos. Por otra parte, en los cultivos jóvenes, la ausencia de relación entre el ATAM y el número de cruces de la baciloscopia pudo ser debido a que el número de células viables en cada muestra no fue proporcional al número de organismos presentes inicialmente en la muestra.

En la comparación de los valores de ATAM de los ácidos micólicos de muestras de expectoración y cultivos jóvenes vs el número de cruces de la baciloscopia, no se incluyeron las muestras que mostraron un patrón de una micobacteria no tuberculosa, ya que estos valores podían estar afectados por la diferencia en el tiempo de crecimiento de las distintas especies de micobacterias.

Al realizar el presente estudio se tuvieron que controlar diversas variables que afectan la detección de micobacterias. Se tuvo especial cuidado con la limpieza del material, debido a que la detección por fluorescencia es un método muy sensible, por lo que puede haber



problemas por contaminación cruzada. Además siempre que se realizó la inyección al Cromatógrafo de Líquidos, la jeringa se lavó previamente por lo menos 5 veces con el cloruro de metileno y se hizo una inyección de un blanco de solvente entre muestras cuando la señal previa de ácidos micólicos fue alta ( $>1$ ).

Al inicio del presente estudio, se tuvieron problemas en la interpretación del patrón cromatográfico debido a un pico interferente ancho que aparecía justo en el intervalo del tiempo de retención de los ácidos micólicos. La realización del análisis cromatográfico de varios blancos de medio Middlebrook 7H9 con y sin suplemento OADC, sin incubar e incubados por 10 días, demostró que la presencia de este pico era debida a uno de los componentes del suplemento OADC. Este problema se eliminó centrifugando la suspensión del cultivo después de la incubación y posteriormente decantando para trabajar únicamente con el paquete celular bacteriano.

Los cultivos jóvenes a 5 días mostraron un bajo porcentaje de detección (41.1%), probablemente debido a que el tiempo de latencia de las micobacterias es muy largo, por lo que en la mayoría de las muestras no se pudo tener un crecimiento detectable. Por este motivo se decidió evaluar la detección de micobacterias en cultivos jóvenes a 10 días.

Se optó también evaluar la prueba rápida de detección e identificación de micobacterias en pacientes con un diagnóstico primario de tuberculosis, así como pacientes que se encontraban bajo tratamiento con antifímicos, por una parte porque este último afecta la viabilidad de las micobacterias en muestras de expectoración y por otra porque el laboratorio que proporcionó las muestras recibió en su mayoría muestras de pacientes que se encontraban bajo control de la enfermedad y pacientes que respondían inadecuadamente al tratamiento.

En este trabajo se pudo constatar que la especie micobacteriana de mayor incidencia en nuestro medio sigue siendo *M. tuberculosis* (96.4%) comparada con el bajo porcentaje (3.6%) que se detectó de micobacterias no tuberculosas. Este método permitió la identificación de las especies de micobacterias no tuberculosas de manera temprana, incluso de manera directa, de las siguientes especies: *M. simiae*, *M. kansasii* y *M. chelonae*. Por otra parte, de un total de 154 muestras analizadas, 4 (2.6%) mostraron en el cultivo joven un patrón característico para *Nocardia spp.*, de tal forma que este método es también útil en el diagnóstico diferencial de enfermedades pulmonares, lo que repercute en la terapéutica y seguimiento de estos pacientes.

La utilidad del análisis de AM en muestras directas y cultivos jóvenes ha sido descrita previamente por Jost *et al.* (29), quienes determinaron una sensibilidad en muestras directas de 33.3% para MAC y de 56.8% para MTB y en cultivos jóvenes una sensibilidad de 93.3% para MAC y de 99% para MTB. Garza-González *et al.* (25), realizaron un estudio en muestras directas de diferentes tipos de especímenes, detectando la presencia de micobacterias con una fuerte señal aún en muestras positivas 1+, sin embargo este estudio fue hecho con pocas muestras y no se llegó a evaluar de manera exhaustiva su utilidad en muestras directas y cultivos jóvenes. A diferencia del trabajo de Jost *et al.*, en el presente trabajo se incluyeron como especímenes clínicos a muestras de pacientes de origen mexicano con BAAR tanto positivo como negativo, provenientes de pacientes con y sin tratamiento antifímico, además de ligeras modificaciones en el tratamiento y análisis de las muestras. Si se considera como paciente con TB activa aquel que resultó positiva la detección de ácidos micólicos en muestra directa o cultivo joven, o bien el cultivo en L-J, los

porcentajes de detección calculados en el presente trabajo coincidirían con la sensibilidad del método, siendo estos un poco menores a los descritos por Jost *et al*.

A pesar del alto costo de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, el sistema puede ser usado en los Laboratorios de Referencia como apoyo diagnóstico rápido en aquellas muestras que se tiene una alto índice de sospecha de la presencia de micobacterias a partir del resultado de la baciloscopía, tanto en muestras directas como cultivos jóvenes. Más aún el costo de los reactivos y consumibles para el método cromatográfico es menor que el asociado a los métodos comúnmente utilizados para la identificación de micobacterias, como son las pruebas bioquímicas, técnicas moleculares y sistemas automatizados.

Por último, ya que el análisis de ácido micólicos puede llevarse a cabo directamente con cultivos jóvenes, se podría utilizar este método como prueba de susceptibilidad a partir muestras directas en vez de la forma indirecta descrita por Viader-Salvadó *et al* (43, 44). Otra posible aplicación de este método podría ser en el monitoreo del tratamiento de pacientes con tuberculosis, para la detección de bacterias viables.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

- Se estableció un criterio para la identificación de *M. tuberculosis* en muestras directas de expectoración en base a su patrón cromatográfico.
- Los resultados en la prueba de ANOVA y comparación múltiple de Tukey indicaron que sólo es posible establecer si una muestra de expectoración se encuentra positiva (3+), en base al ATAM en muestras directas y cultivos jóvenes.
- La rápida detección e identificación de micobacterias por análisis de ácidos micólicos en muestras directas de expectoración resulta ser más eficaz en el caso de muestras con una alta concentración de bacilos (BAAR 3+) que en las muestras con menor número de cruces. El diagnóstico temprano de estos pacientes altamente infecciosos es crítico para romper la cadena de transmisión de la Tuberculosis.
- Esta prueba permitió la identificación de género y especie de manera rápida (24 h) en las muestras directas que fueron positivas para ácidos micólicos (37.5%), lo cual se traduciría en una reducción en el tiempo de reporte así como en la reducción de costos asociados a material y personal.

- La detección de micobacterias por análisis de ácidos micólicos en el medio de cultivo Lowenstein-Jensen fue más baja que la obtenida en la baciloscopia y en el análisis de AM de los cultivos jóvenes a 10 días, a pesar de considerarse éste como el estándar de oro.
- El mayor porcentaje de detección de micobacterias mediante el análisis de ácidos micólicos se logró en los cultivos jóvenes a 10 días en pacientes sin tratamiento antifímico, siendo ésta la mejor alternativa para la detección temprana de casos de tuberculosis.

## REFERENCIAS

1. Abe, C., K. Hirano, M. Wada, Y. Kazumi, M. Takahashi, Y. Fukasawa, T. Yoshimura, C. Miyagi, and S. Goto. 1993. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. *J. Clin. Microbiol.* 31:3270-3274
2. Alshamaony, L., M. Goodfellow, and D. E. Minnikin. 1976. Free mycolic acids as criteria in the clasification of *Nocardia* and the 'rodhochrous' complex. *J. Gen. Microbiol.* 92:188-199.
3. Aselineau, J. And E. Lederer. 1950. Structure of the mycolic acids of mycobacteria. *Nature (London)* 166:782-783.
4. Balandrano Camos S., Anzaldo flores G., Peña Flores G., Betancourt Morillo X., *Manual de Procedimientos de Laboratorio INDRE/ SAGAR, Tuberculosis 18, A.* Escobar Gutiérrez (ed.). Secretaría de Salud, México D.F., 1996.
5. Beavis, K. G., M. B. Lichty, D. L. Jungkind, and O. Giger. 1995. Evaluation of Amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *J. Clin. Microbiol.* 33:2582-2586
6. Besra, G. S., and D. Chatterjee. 1994. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*, p. 285-306. In B. R. Bloom (ed.), *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control.* ASM Press, Washington. D.C.
7. Boogian, K., W. Fierz, P.L. Vernazza, and The Swiss HIV Cohort Study. 1996. Infrequent detection of lipoarabinomannan antibodies in human immunodeficiency virus-associated mycobacterial disease. *J. Clin. Microbiol.* 34:1845-1855.
8. Butler, W. R., and J. O. Kilburn. 1990. High-performance liquid chromatography pattern of mycolic acids as criteria for identification of *Mycobacterium chelonae*,

*Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis*. J. Clin. Microbiol. 28:2094-2098.

9. Butler, W. R., D. G. Ahearn, and J. O. Kilburn. 1986. High-performance liquid chromatography of mycolic acids as a tool in the identification of *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, and *Mycobacterium* species. J. Clin. Microbiol. 23:182-185.
10. Butler, W. R., K. C. Jost, Jr., and J. O. Kilburn. 1991 Identification of micobacteria by high-performance liquid chromatography. J. Clin. Microbiol. 29: 2468-2472.
11. Butler, W. R., M. M. Floyd, V. Silcox, G. Cage, E. Desmond, P. S. Duffey, L. S. Guthertz, W. Gross, K. C. Jost, L. S. Ramos, L. Thibert, and N. Warren (ed.). Sterering Committee, HPLC Users Group.. Standardized method for HPLC identification of mycobacteria. Washington, D.C.: U.S. Department of Healt and Human Services; 1996
12. Center for disease Control and Prevention.. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Health-care facilities, 1994. MMWR 1994;43(No. RR-13). Department of Health and Human Services
13. Center for disease Control and Prevention. 1996. Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 45:950-952.
14. Center for disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological & Biomedical Laboratories. Fourth Edition, May 1999.
15. Centers for Disease Control and Prevention DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES Proposed Guidelines for Goals for Working Safely with *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical, Public Health, and Research Laboratories. 1997
16. Clarridge, J. E., R. M. Shawar, T. M. Shinnick, and B. B. Plikaytis. 1993. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. J. Clin. Microbiol. 31:2049-2056

17. Chiang IH., J. Suo, K.J. Bai, T.P. Lin, K.T. Luh, C.J. Yu, and P.C. Yang. 1997. Serodiagnosis of tuberculosis: a study comparing three specific mycobacterial antigens. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156:906-911
18. Cho, S. N., J. S. Shin, J. D. Kim, and Y. Chong. 1990. Production of monoclonal antibodies to lipoarabinomannan-B and use in the detection of mycobacterial antigens. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156:906-911.
19. D'Amato, R. F., A. A. Wallman, L. H. Hochstein, P. M. Colaninno, M. Scardamaglia, E. Ardila, M. Ghouri, K. Kim, R. C. Patel, and A. Miller. 1995. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *J. Clin. Microbiol.* 33:1832-1834
20. Departamento de Control Epidemiológico de los Servicios de Salud de Nuevo León (Comunicación personal).
21. Etémadi, A. H. 1967. The use of pyrolysis gas chromatography and mass spectroscopy in the study of the structure of mycolic acids. *J. Gas Chromatogr.* 5:447-456
22. Fenton M.J., M.W. Vermeulen. 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect. Immun.* 64:683-690.
23. Forbes, B. A., and K. E. Hicks. 1994. Ability of PCR assay to identify *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC 12B vials. *J. Clin. Microbiol.* 32:1725-1728
24. Gamboa, F., J. Dominguez, E. Padilla, J. M. Manterola, E. Gazapo, J. Lonca, L. Matas, A. Hernandez, P. J. Cardona, and V. Ausina. 1998. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by ligase chain reaction amplification. *J. Clin. Microbiol.* 36:1324-1329
25. Garza-González E. Guerrero-Olazarán M. Tijerina-Menchaca R. Viader-Salvadó JM. 1998. Identification of mycobacteria by mycolic acid pattern. *Archives of Medical Research.* 29: 303-306.
26. Garza-González, E., Guerrero-Olazarán, R. Tijerina-Menchaca, and J.M. Viader-Salvadó. 1997. Determination of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* through mycolic acid analysis. *J. Clin. Microbiol.* 35:1287-1289.



27. Ieven M., and H. Goossens. 1997. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin. Microbiol. Reviews*. 10:242-256.
28. Jonas, V., M. J. Alden, J. I. Curry, K. Kamisango, C. A. Knott, R. Lankford, J. M. Wolfe, and D. F. Moore. 1993. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 31:2410-2416
29. Jost, K. C., Jr., D. F. Dumber, S.S. Barth, V. L. Headley, and L. B. Elliot. 1995. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex directly from smear positive sputum specimens and BACTEC 12 B cultures by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and computer driven pattern recognition models. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1270-1277.
30. Krambovitis, E., M. B. McIllmurray, P. E. Lock, W. Hendrickse, and H. Holzel. 1984. Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by latex particle agglutination. *Lancet* ii:1229-1231.
31. Lechevalier, M.P., A. C. Horan, and H. Lechevalier. 1971. Lipid composition in the clasification of nocardiae and mycobacteria. *J. Bacteriol.* 105:313-318.
32. Lindbrathen, A., P. Gaustad, B. Hovig, and T. Tonjum. 1997. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples from patients in Norway by ligase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 35:3248-3253
33. Metchock B., F. S. Nolte, and R. J. Wallace Jr. *Mycobacterium*. En: *Manual of Clinical Microbiology*. Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A. Tenover F.C., Yolken R.H. (Eds) ASM Press. 7ª. Edición. Washington, D.C. 1999, pp. 399-437.
34. Moore, D. F., and J. I. Curry. 1995. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by Amplicor PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33:2686-2691
35. Organización Mundial de la Salud. Hoja de datos No. 104. Revisada Abril del 2000. <http://www.who.int/home-page/>

36. Pereira L. M., L. N. Nguyen, L. M. Ho, S. Kuijper, H. M. Jansen, and A. H. Kolk. 2000. Development of antigen detection assay for diagnosis of tuberculosis using sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 38:2278-2283.
37. Peterson EM., Nakason A., Platón-DeLeon JM., Jang Y., de la Maza LM., Desmond E. 1999. Comparison of direct and concentrated acid-fast smears to identify specimens culture positive for *Mycobacterium spp.* *J. Clin. Microbiol.* 37:3564-8.
38. Piersimoni C., C. Scaparo, A. Callegaro, C. Paserini, D. Nista, S. Bornigia, M. Scagnelli, A. Rigon, G. Ruggiero, y A. Goglio. 2001. Comparison of MB/BacT Alert 3D system with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 39:651-657
39. Ravligione, M. C., R. J. O'Brien. Tuberculosis. En Harrison Principios de Medicina Interna. Fauci, A. S., E. Raunwald, K.J. Isselbacher, J.D. Wilson, J.B. Martin, D.L. Kasper, S. L. Hauser, D.L. Longo (Eds). Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana. 14 edición 1998, pp. 1149-1161.
40. Sada, E., D. Aguilar, M. Torres, and T. Herrera. 1992. Detection of lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 30:2415-2418
41. Sepkowitz K. A., J. Raffalli, L. Riley, T. E. Kihen, and D. Armstrong. 1995. Tuberculosis in the AIDS Era. *Clin. Microbiol. Reviews.* 8:180-199.
42. Stodola, F. H., A. Lesuk, and R. J. Anderson. 1938 The chemistry of the tubercle bacilli. LIV The isolation and properties of mycolic acids. *J. Biol. Chem.* 126:505-513
43. Viader-Salvadó, J.M., E. Garza-González, M. Guerrero-Olazarán, R. Tijerina-Menchaca, R. Valdéz-Leal, M.A. Bosque-Moncayo. 2001. Mycolic acid index susceptibility method for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 39:2642-2645.

44. Viader-Salvadó, J.M., E. Garza-González, M. Guerrero-Olazarán, R. Tijerina-Menchaca. 2000. Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* through the mycolic acid index. *Methods Mol. Med.* 48:13-19.
45. Vuorinen, P., A. Miettinen, R. Vuento, and O. Hallstrom. 1995. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test and Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test. *J. Clin. Microbiol.* 33:1856-1859
46. Yañez, M. A., M. P. Coppola, D. A. Russo, E. Delaha, S. D. Chaparas, and H. Yeager, Jr. 1986. Determination of mycobacterial antigens in sputum by enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 23:822-825

## APÉNDICE A

### RESULTADOS DE EXÁMENES REALIZADOS

Reg.	Recolección	BAAR	ATAM en MD	id en MD	Inicio CJ	ATAM en CJ	Id en CJ	Inicio CN	CN id x PB	CN id x AM	Obs.
394	13/10/00	1 baar	71.02	—	18/10/01	—	—	17/10/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
397	10/10/00	3+	767.71	M. tuberculosis	18/10/01	—	No id	18/10/00	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
396	10/10/00	3+	361.43	M. tuberculosis	18/10/01	8.05	No id	18/10/00	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
398	16/10/00	2+	109.01	—	18/10/01	—	No id	18/10/00	—	—	CT
401	16/10/00	5 baar	31.80	—	26/10/01	0.36	—	20/10/00	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
403	20/10/00	-	38.15	—	26/10/01	0.32	—	23/10/00	—	—	ST
404	23/10/00	2+	63.97	—	26/10/01	0.03	—	23/10/00	—	—	CT
405	23/10/00	-	26.38	—	26/10/01	0.0	—	23/10/00	—	—	CT
407	24/10/00	2+	26.38	—	26/10/01	0.59	No id	25/10/00	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
428	10/11/00	-	349.75	—	18/11/01	0.06	—	13/11/00	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
429	10/11/00	-	68.57	—	18/11/01	3.10	—	13/11/00	—	—	CT
430	11/11/00	-	76.30	—	18/11/01	—	—	13/11/00	—	—	ST
433	14/11/00	3+	91.44	—	18/11/01	—	No id	16/11/00	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
25	13/02/01	-	73.10	—	20/02/01	165.67	—	14/02/01	—	—	ST
27	13/02/01	2+	63.53	—	20/02/01	50.88	—	18/02/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
28	15/02/01	2+	77.96	M. tuberculosis	20/02/01	81.17	—	16/02/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
29	13/02/01	2+	91.94	—	20/02/01	210.68	Nocardia spp	16/02/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
30	16/02/01	3+	885.41	M. tuberculosis	20/02/01	244.33	M. tuberculosis	16/02/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
31	15/02/01	-	55.38	—	20/02/01	187.79	—	20/02/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
32	15/02/01	3+	406.99	M. tuberculosis	20/02/01	245.15	M. tuberculosis	20/02/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
33	19/02/01	-	67.21	—	20/02/01	157.67	—	20/02/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
34	19/02/01	2+	58.22	—	20/02/01	7.88	—	20/02/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
35	20/02/01	3+	44.97	No id	26/02/01	—	Nocardia spp	21/02/01	—	—	CT
36	20/02/01	4 baar	37.59	—	26/02/01	—	—	21/02/01	—	—	CT

BAAR bacilos ácido alcohol resistente, ATAM área total de los ácidos micólicos, MD muestra directa, CJ cultivo joven en Middlebrook 7H8, CN cultivo normal en L-J, PB pruebas bioquímicas, id identificación, CT con tratamiento antifímico, ST sin tratamiento antifímico.

APÉNDICE A (Continuación)

Reg.	Recolección	BAAR	ATAM en MD	id en MD	Inicio CJ	ATAM en CJ	Id en CJ	Inicio CN	CN id x PB	CN id x AM	Obs.
37	21/02/01	2+	29.29	---	28/02/01	---	---	22/02/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
39	21/02/01	2+	12.52	---	28/02/01	---	---	22/02/01	---	---	ST
41	21/02/01	-	108.94	---	28/02/01	---	---	23/02/01	---	---	CT
49	28/02/01	1+	0.21	---	07/03/01	0.58	---	02/03/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
62	05/03/01	-	39.42	---	07/03/01	0.00	---	06/03/01	---	---	CT
64	07/03/01	-	4.39	---	09/03/01	0.12	---	08/03/01	---	---	CT
65	06/03/01	-	45.52	---	09/03/01	0.21	---	08/03/01	---	---	ST
66	06/03/01	-	31.82	---	09/03/01	0.08	---	08/03/01	---	---	CT
68	08/03/01	-	64.81	---	12/03/01	1.69	---	08/03/01	---	---	CT
69	13/03/01	2+	108.84	---	15/03/01	0.36	No id	14/03/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
91	13/03/01	-	4.38	---	15/03/01	0.08	---	14/03/01	---	---	CT
66	15/03/01	2+	55.54	---	20/03/01	0.48	No id	15/03/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
66	14/03/01	-	137.45	---	20/03/01	0.19	---	15/03/01	---	---	CT
69	15/03/01	2+	18.87	---	20/03/01	10.89	M. tuberculosis	16/03/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
70	16/03/01	2+	167.24	---	20/03/01	---	M. tuberculosis	19/03/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
73	18/03/01	3+	96.35	M. tuberculosis	22/03/01	7.61	M. tuberculosis	20/03/01	---	---	ST
74	15/03/01	2+	18.57	---	22/03/01	18.62	M. tuberculosis	23/03/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
77	20/03/01	-	25.39	---	28/03/01	0.10	---	23/03/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
78	20/03/01	-	102.35	---	28/03/01	0.39	---	23/03/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
79	20/03/01	-	82.08	---	28/03/01	0.01	---	23/03/01	---	---	CT
80	20/03/01	-	27.89	---	28/03/01	0.04	---	23/03/01	---	---	CT
81	20/03/01	-	70.24	---	28/03/01	1.17	No carda spp	23/03/01	---	---	ST
82	26/03/01	3+	967.74	M. tuberculosis	28/03/01	883.83	M. tuberculosis	27/03/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
83	23/03/01	2+	43.67	---	28/03/01	40.97	M. tuberculosis	27/03/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
94	23/03/01	2+	246.18	---	30/03/01	0.33	---	29/03/01	---	---	CT
86	29/03/01	2+	40.99	---	30/03/01	0.83	M. tuberculosis	29/03/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
87	29/03/01	2+	40.8	---	02/04/01	2.41	No id	30/03/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
88	04/04/01	1+	16.87	---	06/04/01	5.83	---	05/04/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
89	05/04/01	8 bear	41.31	---	06/04/01	0.08	---	05/04/01	---	---	CT
90	03/04/01	3+	259.75	M. tuberculosis	08/04/01	37.26	M. tuberculosis	05/04/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST

BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes; ATAM: área total de los ácidos micólicos; MD: muestra directa; CJ: cultivo joven en Mictatook 7H9; CN: cultivo normal en L-J; PB: pruebas bioquímicas; id: identificación; CT: con tratamiento antituberculoso; ST: sin tratamiento antituberculoso.

## APÉNDICE A (Continuación)

Reg.	Recolección	BAAR	ATAM en MD	Id en MD	Inicio CJ	ATAM en CJ	Id en CJ	Inicio CN	CN Id x PB	CN Id x AM	Obs.
91	04/04/01	2 bear	29.78	---	06/04/01	1.28	No Id	05/04/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
92	05/04/01	1+	76.28	---	06/04/01	1.58	---	05/04/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
93	10/04/01	6 bear	3.51	---	11/04/01	1.58	M. tuberculosis	10/04/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
94	10/04/01	-	54.77	---	11/04/01	0.16	---	11/04/01	---	---	CT
97	16/04/01	2+	21.71	M. tuberculosis	19/04/01	3.86	M. tuberculosis	17/04/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
98	17/04/01	2+	37.32	---	24/04/01	4.13	M. tuberculosis	20/04/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
100	19/04/01	7 bear	56.13	---	24/04/01	0.17	---	20/04/01	---	---	CT
106	22/04/01	-	13.66	---	26/04/01	0.36	---	25/04/01	---	---	CT
111	26/04/01	2+	11.09	---	27/04/01	0.94	No Id	26/04/01	---	---	ST
119	03/05/01	11bear	43.83	---	04/05/01	0.16	Noarria spp	03/05/01	---	---	CT
121	05/05/01	3+	69.13	No Id	08/05/01	22.85	M. tuberculosis	08/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
123	08/05/01	3+	23.61	M. tuberculosis	11/05/01	470.53	M. tuberculosis	10/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
124	10/05/01	3+	271.77	M. tuberculosis	11/05/01	63.19	M. tuberculosis	10/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
126	10/05/01	-	60.31	---	11/05/01	3.90	No Id	10/05/01	---	---	CT
126	08/05/01	3+	42.54	M. tuberculosis	11/05/01	88.37	M. tuberculosis	14/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
127	14/05/01	-	1.82	---	18/05/01	0.00	---	16/05/01	---	---	ST
128	07/05/01	-	12.93	---	18/05/01	0.40	No Id	16/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
130	15/05/01	2+	7.47	---	18/05/01	2.96	M. tuberculosis	16/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
131	17/05/01	-	15.67	---	18/05/01	0.25	---	17/05/01	---	---	ST
132	17/05/01	1+	108.94	---	21/05/01	0.49	---	18/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
133	17/05/01	3+	82.44	M. tuberculosis	21/05/01	1616.82	M. tuberculosis	18/05/01	---	---	ST
134	16/05/01	3+	125.87	M. tuberculosis	21/05/01	636.30	M. tuberculosis	18/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
136	21/05/01	3+	23.26	M. tuberculosis	24/05/01	397.92	M. tuberculosis	21/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
137	21/05/01	-	13.27	---	24/05/01	0.18	---	22/05/01	---	---	ST
138	18/05/01	3+	36.89	M. tuberculosis	24/05/01	17.90	M. tuberculosis	22/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
139	22/05/01	-	55.45	---	24/05/01	0.00	---	23/05/01	---	---	CT
140	22/05/01	2+	69.96	---	24/05/01	0.62	No Id	23/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
141	23/05/01	1+	8.77	---	30/05/01	3.98	M. tuberculosis	24/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
142	28/05/01	2+	7.62	---	30/05/01	0.61	No Id	29/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
143	28/05/01	2+	60.16	---	30/05/01	199.36	M. tuberculosis	29/05/01	---	---	CT

BAAR bacilos ácido alcohol resistentes, ATAM área total de los ácidos micólicos, MD muestra directa, CJ cultivo joven en Middlebrook 7H8, CN cultivo normal en L-J, PB pruebas bioluminiscentes, Id identificación, CT con tratamiento antituberculoso, ST sin tratamiento antituberculoso.

## APÉNDICE A (Continuación)

Reg.	Recolección	BAAR	ATAM en MD	id en MD	Inicio CJ	ATAM en CJ	Id en CJ	Inicio CN	CN id x PB	CN id x AM	Obs.
146	30/05/01	3+	48.36	—	04/06/01	7.73	M. tuberculosis	30/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
147	30/05/01	1+	51.46	—	04/06/01	5.94	M. tuberculosis	31/05/01	—	—	CT
148	29/05/01	-	13.88	—	04/06/01	0.28	—	31/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
149	30/05/01	1+	15.68	—	04/06/01	0.32	—	31/05/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
151	31/05/01	-	60.81	—	06/06/01	0.27	—	31/05/01	—	—	CT
154	31/05/01	3+	76.77	—	08/06/01	-	M. simiae	04/06/01	M. simiae	M. simiae	CT
157	01/06/01	3+	15.94	M. tuberculosis	08/06/01	363.57	M. tuberculosis	04/06/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
160	04/06/01	-	18.85	—	08/06/01	0.04	—	05/06/01	—	—	CT
162	04/06/01	2+	16.72	—	08/06/01	12.24	M. tuberculosis	06/06/01	—	—	CT
164	06/06/01	2+	107.10	M. chelonae	08/06/01	-	M. chelonae	07/06/01	M. chelonae	M. chelonae	ST
166	07/06/01	-	40.56	—	14/06/01	2.57	M. tuberculosis	08/06/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
168	12/06/01	-	21.41	—	14/06/01	0.3	—	13/06/01	—	—	CT
169	12/06/01	-	6.54	—	14/06/01	0.15	—	13/06/01	—	—	CT
170	12/06/01	-	21.61	—	14/06/01	0.038	—	13/06/01	—	—	ST
171	13/06/01	-	4.04	—	20/06/01	12.48	M. tuberculosis	15/06/01	—	—	ST
172	14/06/01	3+	406.84	M. tuberculosis	20/06/01	103.41	M. tuberculosis	19/06/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
174	21/06/01	3+	0.07	—	25/06/01	433.55	M. tuberculosis	22/06/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
179	26/06/01	3+	622.55	M. tuberculosis	28/06/01	-	M. tuberculosis	27/06/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
184	31/06/01	-	29.49	—	01/07/01	1.85	No id	04/07/01	—	—	CT
188	04/07/01	1+	357.75	M. tuberculosis	06/07/01	0.32	No id	05/07/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
189	03/07/01	3+	148.36	M. tuberculosis	06/07/01	646.70	M. tuberculosis	05/07/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
190	08/07/01	1+	44.11	—	11/07/01	12.39	No id	05/07/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
194	09/07/01	3+	219.88	M. tuberculosis	11/07/01	1382.13	M. tuberculosis	10/07/01	—	—	ST
197	12/07/01	2+	48.30	—	13/07/01	26.99	M. tuberculosis	12/07/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
198	11/07/01	3+	63.54	M. tuberculosis	13/07/01	146.13	M. tuberculosis	12/07/01	—	—	CT
199	10/07/01	-	12.74	—	13/07/01	2.16	M. tuberculosis	12/07/01	—	—	CT
200	11/07/01	-	125.63	—	13/07/01	2.02	M. tuberculosis	12/07/01	—	—	CT
202	13/07/01	-	11.81	—	17/07/01	1.64	No MTB	13/07/01	—	—	CT
204	13/07/01	1+	26.15	—	17/07/01	1.10	—	13/07/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
206	12/07/01	-	3.18	—	17/07/01	0.30	—	16/07/01	—	—	CT

BAAR bacilos ácido alcohol resistentes, ATAM área total de los ácidos micólicos, MD muestra directa, CJ cultivo joven en Middlebrook 7H9, CN cultivo normal en L-J, PB pruebas bioquímicas, id identificación, CT con tratamiento antituberculoso, ST en tratamiento antituberculoso.

APÉNDICE A (Continuación)

Reg.	Recolección	BAAR	ATAM en MD	id en MD	Inicio CJ	ATAM en CJ	id en CJ	Inicio CN	CN Id x PB	CN Id x AM	Obs.
207	13/07/01	1+	13.34	—	17/07/01	0.50	—	16/07/01	—	—	CT
208	13/07/01	1+	15.97	—	17/07/01	17.69	M. tuberculosis	16/07/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
210	17/07/01	-	11.16	—	19/07/01	0.06	—	17/07/01	—	—	CT
211	17/07/01	2+	14.95	—	19/07/01	10.21	M. tuberculosis	17/07/01	—	—	CT
212	17/07/01	-	44.77	—	19/07/01	0.08	—	17/07/01	—	—	CT
213	17/07/01	1+	53.66	—	19/07/01	34.60	M. tuberculosis	17/07/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
214	17/07/01	1+	7.96	—	19/07/01	0.00	—	17/07/01	—	—	CT
216	17/07/01	-	19.82	—	19/07/01	4.69	M. tuberculosis	17/07/01	—	—	CT
218	17/07/01	1+	178.00	—	19/07/01	2.10	M. tuberculosis	18/07/01	—	—	CT
218	17/07/01	3+	13.84	M. tuberculosis	19/07/01	127.1	M. tuberculosis	18/07/01	—	—	CT
219	16/08/01	-	2.59	—	24/07/01	0.00	—	20/07/01	—	—	CT
220	20/07/01	-	25.38	—	27/07/01	0.00	—	20/07/01	—	—	ST
221	17/07/01	3+	1.62	No Id	27/07/01	7.42	M. tuberculosis	23/07/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
222	19/07/01	3+	33.93	—	27/07/01	9.45	M. tuberculosis	23/07/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
224	23/07/01	3+	318.36	M. tuberculosis	01/08/01	31.60	M. tuberculosis	24/07/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
227	25/07/01	3+	143.35	—	01/08/01	413.13	M. tuberculosis	25/07/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
230	20/07/01	-	20.34	—	01/08/01	1.27	M. tuberculosis	26/07/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
231	20/07/01	3+	71.71	M. tuberculosis	01/08/01	6.00	M. tuberculosis	26/07/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
233	31/07/01	3+	94.75	M. tuberculosis	03/08/01	11.53	M. tuberculosis	31/07/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
234	31/07/01	3+	63.94	—	03/08/01	5.58	M. tuberculosis	01/08/01	—	—	CT
235	31/07/01	-	6.59	—	03/08/01	0.74	M. tuberculosis	01/08/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
236	02/08/01	-	37.64	—	08/08/01	0.32	—	03/08/01	—	—	CT
237	30/07/01	1+	16.33	—	08/08/01	1.03	M. tuberculosis	03/08/01	—	—	CT
238	02/08/01	3+	71.39	M. tuberculosis	08/08/01	174.90	M. tuberculosis	06/08/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
239	07/08/01	2+	6.37	—	16/08/01	2.11	No Id	08/08/01	—	—	ST
241	08/08/01	3+	46.54	No Id	16/08/01	13.45	M. tuberculosis	10/08/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
242	10/08/01	3+	866.06	M. tuberculosis	16/08/01	11.52	M. tuberculosis	10/08/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
249	16/08/01	-	24.16	—	16/08/01	9.41	M. tuberculosis	16/08/01	—	—	CT
252	17/08/01	3+	43.65	M. tuberculosis	20/08/01	38.76	M. tuberculosis	17/08/01	—	—	ST
254	17/08/01	1+	71.83	—	20/08/01	2.41	M. tuberculosis	17/08/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST

BAAR bacilos ácido alcohol resistentes; ATAM área total de los ácidos micólicos; MD muestra directa, CJ cultivo joven en Middlebrook 7H9, CN cultivo normal en L-J, PB pruebas bioquímicas, Id identificación, CT con tratamiento antituberculoso, ST sin tratamiento antituberculoso.



## APÉNDICE A (Continuación)

Reg.	Recolección	BAAR	ATAM en MD	id en MD	Inicio CJ	ATAM en CJ	id en CJ	Inicio CN	CN id x PB	CN id x AM	Obs.
255	17/08/01	3+	14.69	M. tuberculosis	24/08/01	4.98	M. tuberculosis	20/08/01	M. Kansasi	M. Kansasi	CT
256	21/08/01	-	12.37	—	24/08/01	3.55	M. tuberculosis	21/08/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
257	21/08/01	1+	6.10	M. tuberculosis	24/08/01	5.68	M. tuberculosis	21/08/01	—	—	ST
258	22/08/01	1+	3.38	—	24/08/01	3.25	M. tuberculosis	22/08/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
261	23/08/01	-	31.83	—	28/08/01	1.27	—	24/08/01	—	—	CT
263	21/08/01	2+	3.54	—	28/08/01	4.76	M. tuberculosis	24/08/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
264	23/08/01	2+	630.08	M. tuberculosis	28/08/01	78.16	M. tuberculosis	24/08/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	ST
265	27/08/01	2+	29.93	—	28/08/01	5.77	M. tuberculosis	27/08/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
271	28/08/01	1+	62.84	—	31/08/01	2.34	M. tuberculosis	28/08/01	M. tuberculosis	M. tuberculosis	CT
276	28/08/01	1+	11.92	—	04/09/01	1.53	—	31/08/01	—	—	CT

BAAR bacilos ácido alcohol resistente, ATAM área total de los ácidos micólicos, MD muestra directa, CJ cultivo joven en Middlebrook 7H9, CN cultivo normal en L-J, PB pruebas bioquímicas, id identificación, CT con tratamiento antituberculoso, ST sin tratamiento antituberculoso.

## APENDICE B

### CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *M. tuberculosis* POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS

#### *Características Morfológicas:*

Para la caracterización morfológica de *M. tuberculosis* en medio L-J se consideraron las siguientes características: colonias típicas blancas a color crema, de aspecto rugoso a seco que con el tiempo toman la forma de coliflor, se desarrollan en la superficie del medio y el sitio en el que se implantan no cambia de color, el crecimiento es eugónico.

Para evaluar la morfología celular se consideraron las siguientes características: bacilos de longitud mediana que miden de 2 a 6 por 0.3  $\mu\text{m}$ . Generalmente son de forma ligeramente curva. En cultivo, los bacilos en ocasiones forman cordones serpentinos que tienden a ser extensos.

#### *Características fisiológicas:*

Acumulación de niacina. Es positivo para *M. tuberculosis*, sin embargo también sucede con *M. simiae* y algunas cepas de *M. marinum* y *M. chelonae*, ya que todas comparten la ausencia de la enzima que convierte la niacina en niacinaribonucleótido.

Reducción de nitratos a nitritos. Es positivo para *M. tuberculosis*, pero también lo es en otras como *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. fortuitum*.

Actividad de catalasa: la catalasa de *M. tuberculosis* presenta termolabilidad positiva, lo cual también ocurre en *M. bovis* y *M. gastri*

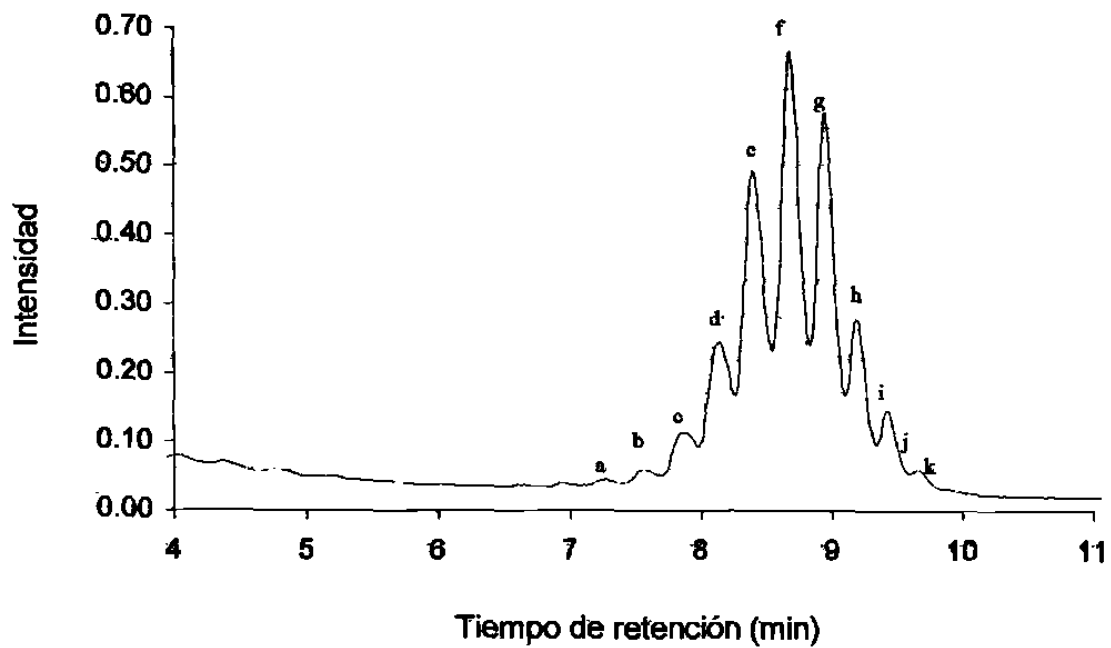
### CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *M. tuberculosis* POR CLAR.

Para establecer el criterio para la identificación de *M. tuberculosis* por CLAR se determinó la reproducibilidad del tiempo de retención y la altura relativa de los picos cromatográficos del intervalo de 7.4 y 9.9 min empleando cinco análisis de ácidos micólicos realizados en días diferentes con una cepa testigo de *M. tuberculosis* H37Ra y cuatro aislamientos clínicos identificados correctamente por pruebas bioquímicas como *M. tuberculosis* (Tabla III). Para los cultivos jóvenes y cultivos en L-J se considero la presencia de *M. tuberculosis* si todos los picos del intervalo de 7.4 y 9.9 min estuvieron comprendidos en el intervalo de dos desviaciones estándar tanto en tiempo de retención como en altura relativa. Para las muestras directas se empleó el mismo criterio de identificación que en las muestras de cultivos jóvenes y cultivos en L-J, excepto para la relación de alturas de los primeros dos picos, marcados como a y b, para los cuales se aceptó que no estuvieran dentro del intervalo establecido.

Tabla III. Reproducibilidad del tiempo de retención y altura relativa de los picos cromatográficos de *M. tuberculosis* (n=5).

Pico Cromatográfico	Tiempo de retención ( $\bar{X} \pm S$ ) <sup>a</sup>	Altura Relativa ( $\bar{X} \pm S$ )
a	7.21 ± 0.07	0.002 ± 0.002
b	7.47 ± 0.14	0.005 ± 0.006
c	7.65 ± 0.09	0.011 ± 0.017
d	7.91 ± 0.08	0.026 ± 0.026
e	8.13 ± 0.12	0.056 ± 0.037
f	8.37 ± 0.10	0.135 ± 0.065
g	8.63 ± 0.10	0.230 ± 0.051
h	8.90 ± 0.10	0.265 ± 0.034
i	9.14 ± 0.09	0.164 ± 0.065
j	9.37 ± 0.09	0.081 ± 0.052
k	9.59 ± 0.08	0.025 ± 0.033

<sup>a</sup> X: media, S: desviación estándar, a: CV < 1.8%,



**Fig. 9.** Patrón cromatográfico característico de derivados fluorescentes de ácidos micóticos de *M. tuberculosis*. Las letras indican la disposición de los picos.

## APENDICE C

### PREPARACION DE REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser grado reactivo y los solventes grado HPLC.

La esterilización de las soluciones debe llevarse a cabo a 15 lb/in<sup>2</sup> y 121°C por espacio de 15 minutos.

#### **Fucsina fenicada**

Disolver por agitación 3 g de Fucsina básica en un matraz aforado, agregando lentamente alcohol etílico de 95°, y añadir 55 mL de fenol acuoso. Aforar a 100 mL con el alcohol. Almacenar a temperatura ambiente en frasco de vidrio ámbar.

#### **Fenol acuoso**

Calentar en baño María 100 g de fenol en cristales hasta la disolución completa del fenol y enfriar. Agitar y agregar agua destilada hasta completar 1 L. Filtrar una vez por semana. Almacenar a temperatura ambiente en frasco de vidrio ámbar.

#### **Azul de metileno**

Disolver por agitación 1 g de azul de metileno en 100 mL de alcohol etílico de 95° y agregar agua destilada hasta completar 1000 mL. Filtrar. Almacenar a temperatura ambiente en frasco de vidrio ámbar.

#### **Solución decolorante (alcohol-ácido)**

Dejar escurrir lentamente 30 mL de ácido clorhídrico concentrado por las paredes de un matraz que contenga 970 mL de alcohol etílico de 95°. Agitar suavemente. Almacenar a temperatura ambiente en recipiente plástico.

### **Hidróxido de sodio al 4% con rojo fenol**

En un matraz aforado que contenga aproximadamente 500 mL de agua destilada, agregar 40 g de hidróxido de sodio y se disolver por agitación. Seguir agregando agua hasta completar los 1000 mL. Añadir 0.04 g del indicador rojo de fenol y agitar suavemente hasta su completa disolución y homogenización. Almacenar a temperatura ambiente en recipiente plástico.

### **Ácido clorhídrico 1 N**

Dejar escurrir lentamente 36.5 mL de ácido clorhídrico concentrado por la pared de un matraz aforado que contiene agua destilada. Agitar suavemente y seguir añadiendo agua hasta completar 1000 mL. Se recomienda envasarlos en cantidades de 20 a 50 mL cada uno. Esterilizar antes de ser usado. Almacenar a temperatura ambiente en frasco de vidrio ámbar.

### **Buffer de fosfatos (pH 6.8, 0.067 M)**

Mezclar 50 mL de solución A (Fosfato disódico 0.067 M y 9.47 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro en 1 litro de agua destilada) y 50 mL de solución B (Fosfato monopotásico 0.067 M y 9.07 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 1 L de agua destilada). Si al final el buffer requiere ajuste de pH, añadir solución A para aumentar el pH o solución B para bajarlo. Almacenar a temperatura ambiente en frasco de vidrio ámbar.

### **Sustrato amortiguador para nitratos (pH 7.0)**

Disolver 0.085 g de Nitrato de Sodio, 0.117 g de Fosfato monopotásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.485 g de Fosfato disódico  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro, en 100 mL de agua destilada. Ajustar la solución a pH 7.0 y esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente en frasco de vidrio ámbar.

### **Medio de Lowenstein-Jensen**

Disolver 2.4 g de fosfato monopotásico anhidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0.24 g de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0.6 g de citrato de magnesio y 3.6 g de L-asparagina en 200 mL de agua destilada. Es necesario calentar suavemente a baño maría para la disolución de la asparagina. Filtrar en un matraz de 2000 mL de capacidad. Agregar 12 mL de glicerina bidestilada y agua destilada hasta completar 600 mL. Esterilizar en el autoclave durante 15 minutos a  $120^\circ\text{C}$  y dejar enfriar. Agregar huevos frescos, limpiarlos previamente y con cuidado con un cepillo, agua y jabón y dejar algunos minutos en agua jabonosa. Enjuagar con agua corriente y limpiar con una gasa embebida en alcohol de  $70^\circ$ . Con las manos bien lavadas, quebrar los huevos uno a uno en un vaso estéril

Observar cada huevo, que para ser utilizado debe tener yema firme, que permanezca redonda, sin aplastarse ni romperse. Vaciar 1 L de huevos en un vaso de licuadora y homogenizar durante algunos segundos. Todo el material debe estar estéril. Vaciar los huevos homogenizados en el matraz que contiene la solución con sales, asparagina y glicerina. Agregar enseguida 20 mL de una solución acuosa al 2% de verde de malaquita recién preparada, filtrada y esterilizada. Mezclar bien agitando manualmente el matraz y luego dejar reposar para que las burbujas de aire contenidas en el medio asciendan a la superficie y se eliminen. Para distribuir el medio de cultivo en tubos, todo el material de vidrio a emplear debe estar escrupulosamente limpio y enjuagado antes de ser esterilizado. Distribuir el medio en tubos, en condiciones de esterilidad. La cantidad de medio en cada tubo (5 mL) debe ser la suficiente para obtener, una vez coagulado el medio, un plano inclinado. Es importante que queden por lo menos 3 cm entre la boca del tubo y el extremo del plano inclinado. Al distribuir, evitar la formación de burbujas dejando escurrir el medio de cultivo por la pared interna del tubo. Colocar en la estufa los tubos evitando girarlos. Se dejan coagular los tubos a 85°C por espacio de 50 minutos. Terminado este tiempo, retirar los tubos, evitando su enfriamiento brusco. Una vez a temperatura ambiente llevarlos a la incubadora a 37°C dejándolos durante 48 horas para controlar su esterilidad y eliminar el agua de condensación. Se recomienda no usar el medio después de dos meses de su preparación.

### **Medio Middlebrook 7H9**

Preparar de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial Becton Dickinson Microbiology. Suspender 4.7 g de la base en 900 mL de agua destilada conteniendo 2 mL de glicerol. Dispensar en cantidades de 180 mL y esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar a 45°C y asépticamente añadir 20 mL de suplemento de enriquecimiento Middlebrook OADC. Distribuir en alícuotas de 1 mL en tubos con tapón de rosca de 15 x 150 y guardar en congelación hasta su uso. Al momento de usarse añadir 0.115 mL de suplemento antibiótico PANTA en condiciones de esterilidad.

### **Suplemento de enriquecimiento OADC**

Este suplemento es provisto por la casa comercial Becton Dickinson en tubos de 20 mL cada uno, y por cada litro de agua purificada contiene 50.0 g de albúmina bovina, 20.0 g de dextrosa, 0.03 g de catalasa, y 0.6 mL de ácido oleico. En cuanto se reciba este reactivo guardar en un sitio oscuro entre 2-8°C. Evitar la congelación o el sobrecalentamiento. Reducir al mínimo la exposición a la luz.

### **Mezcla antibiótica PANTA**

Provista por la casa comercial Becton Dickinson, en frascos liofilizados cada uno de los cuales contiene 6,000 unidades de Polimixina B, 2400 unidades de Ácido nalidíxico, 500 unidades de Azlocilina, 600 µg de Anfotericina B y 600 µg de Trimetoprima.

Reconstituir la mezcla de antibióticos liofilizada con 15 mL de agua destilada estéril y guardar en alícuotas de 0.5 mL en tubos eppendorf a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Una vez reconstituida es estable 90 días guardada a ésta temperatura.

#### **Hidróxido de potasio al 75%**

Pesar 18.75 g de KOH en lentejas aforar a 25 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente en contenedor de plástico.

#### **Hidróxido de potasio al 25%**

Pesar 6.25 g de KOH en lentejas y se afora a 25 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente en contenedor de plástico.

#### **Acido clorhídrico 6 N**

Dejar escurrir lentamente 12.5 mL de HCl concentrado por las paredes de un matraz de aforación que contenga agua destilada. Agitar suavemente y aforar a 25 mL con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente en frasco de vidrio ámbar.

#### **Bicarbonato de potasio: 0.2 M en agua-metanol (1:1 vol/vol)**

Pesar 0.5 g de  $\text{KHCO}_3$  y aforar a 25 mL con una mezcla de Metanol-agua (1:1, vol/vol). Almacenar a temperatura ambiente en frasco de vidrio ámbar.

#### **Colorante rojo congo al 1%**

Pesar 0.25 g del colorante y disolver en 25 mL de agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente en frasco de vidrio ámbar.

#### **Reactivo de derivatización**

Mezclar 1.25 mg de 4-bromometil-6,7-dimetoxicumarina y 0.15 mg de éter 18-corona-6 por cada mL de cloruro de metileno. El reactivo es estable y puede ser almacenado por largo tiempo en un congelador para evitar evaporación del solvente, en frasco de vidrio ámbar.





DONATIVO

