

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



SENSIBILIDAD DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS A ESTREPTOMICINA E
ISONIACIDA DETERMINADA POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE
ALTA RESOLUCION Y POR DILUCION Y SIEMBRA EN PLACA

POR

ELVIRA GARZA GONZALEZ

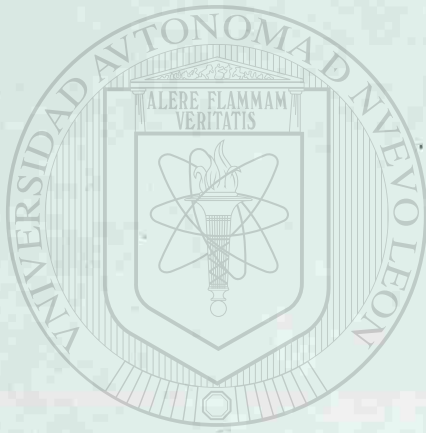
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS CON ESPECIALIDAD EN
QUIMICA ANALITICA

ENERO, 1996

IN
QR201
.26
G3
C41



1080074580



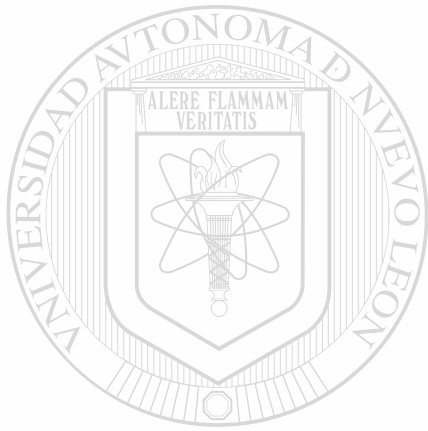
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**BIBLIOTECA, DIVISION
ESTUDIOS SUPERIORES**



UANL

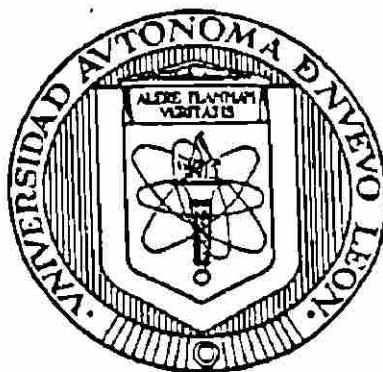
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**SENSIBILIDAD DE *Mycobacterium tuberculosis* A ESTREPTOMICINA E
ISONIACIDA DETERMINADA POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE
ALTA RESOLUCIÓN Y POR DILUCIÓN Y SIEMBRA EN PLACA**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

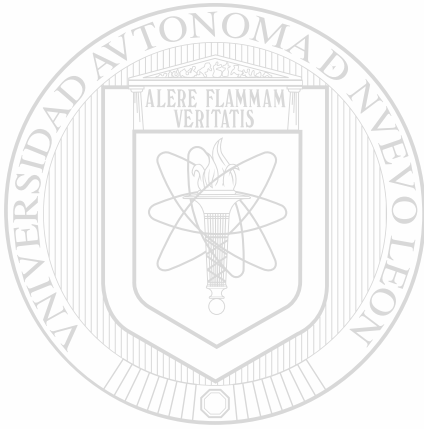
ELVIRA GARZA GONZÁLEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Analítica

Enero, 1996

BIBLIOTECA, DIVISION
ESTUDIOS SUPERIORES

TM
QR201
T14
T3



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

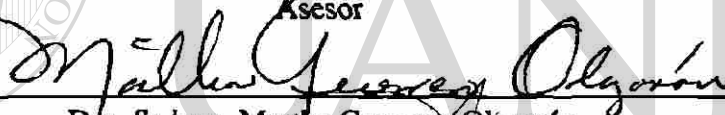


**SENSIBILIDAD DE *Mycobacterium tuberculosis* A ESTREPTOMICINA E
ISONIACIDA DETERMINADA POR CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDOS DE
ALTA RESOLUCIÓN Y POR DILUCIÓN Y SIEMBRA EN PLACA**

Aprobación de la Tesis:



Dr. Ing. Quim. José Ma. Viader Salvadó
Asesor



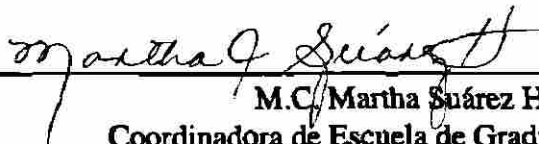
Dra. Sc hum. Martha Guerrero Olazarán
Coasesora



Dr. med. Rolando Tijerina Menchaca
Coasesor



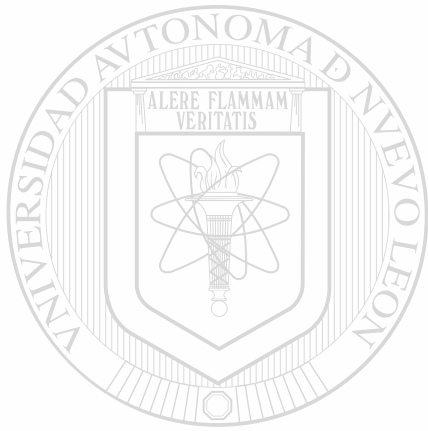
M.C. Ma. Teresa Garza de Verduzco
Revisora



M.C. Martha Suárez Herrera
Coordinadora de Escuela de Graduados en Ciencias

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca académica otorgada con oficio 62450 y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El presente trabajo de tesis se realizó en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, U.A.N.L. y en el Laboratorio de Química Biomolecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, U.A.N.L.



Asesor:

Coasesora:

Coasesor:

Dr. José M. Viader Salvadó

Dra. Martha Guerrero Olazarán

Dr. Rolando Tijerina Menchaca

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

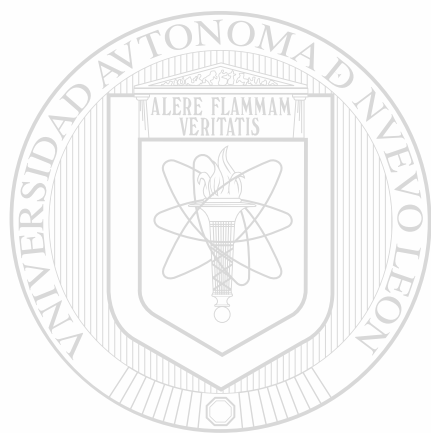
ATAM	Área total correspondiente a los picos de ácidos micólicos
ATC	Ácido tricarboxílico
CGL	Cromatografía gas-líquido
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
DHFR	Dihidrolotoreductasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EM	<i>Emden Meyerhof</i>
FIM	Fosfatidil inositol manósido
g	Gramos
HEPA	High efficiency particulate air (Filtro de alta eficiencia de captura)
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía de líquidos de alta resolución)
LJ	Lowenstein Jensen
ml	Mililitro
µg	Microgramos
NAP	p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona
nm	Nanómetros
PABA	Ácido p-aminobenzoico
PAS	Ácido p-aminosalicílico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPD	Protein purificate derivate (Derivado proteico purificado)
RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
UFC	Unidades formadoras de colonia

UV-VIS

Ultravioleta-visible

VIH

Virus de inmunodeficiencia humana



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Metabolismo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
2	Estructura de la envoltura micobacteriana	5
3	Estructura de los ácido micólicos	6
4	Estructura del factor cuerda	6
5	Mecanismo de captura de Fe ⁺³ en la micobacteria	8
6	Distribución global estimada de adultos infectados con SIDA y tuberculosis a mitad de 1993	10
7	Sitios de acción de algunos antifímicos	16
8	Estrategia general seguida para desarrollar el método para determinar la sensibilidad de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a isoniacida y estreptomcina	21
9	Preparación del material biológico	23
10	Obtención, manejo y análisis de las muestras en los estudios cinéticos	28
11	Cromatogramas característicos de ácidos micólicos	39
12	Variación de las UFC/ml vs ATAM	41
13	Variación del Log UFC/ml vs ATAM	41
14	Variación del log UFC/ml vs tiempo y del ATAM vs tiempo	42
15	Cinéticas de crecimiento en presencia de antifímico	44

TABLA DE CONTENIDO

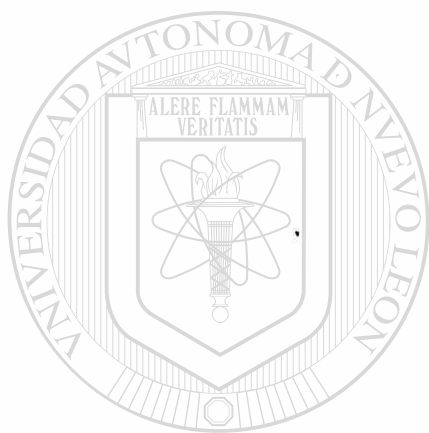
Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Historia de la tuberculosis	1
1.2 Características de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
1.2.1 Características taxonómicas	1
1.2.2 Metabolismo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
1.2.3 Componentes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
1.2.3.1 Envoltura celular	4
1.2.3.2 Ácidos micólicos	5
1.3 Tuberculosis	6
1.3.1 Patogenicidad de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
1.3.2 Tuberculosis clínica	8
1.3.3 Epidemiología de la tuberculosis	10
1.4 Métodos de laboratorio para el diagnóstico de la tuberculosis	11
1.4.1 Tinción de Zhiel-Neelsen	11
1.4.2 Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
1.4.3 Método radiométrico	12
1.4.4 Pruebas genéticas	13
1.4.5 Métodos cromatográficos	14
1.5 Tratamiento de la tuberculosis	15
1.5.1 Antifímicos empleados	15
1.5.2 Sensibilidad y resistencia	16
1.5.3 Pruebas de sensibilidad	17
1.6 Objetivos	19
2 MATERIAL Y MÉTODOS	20
2.1 Estrategia general	20
2.2 Elementos de bioseguridad	22

Capítulo	Página
2.3 Preparación del material biológico	23
2.3.1 Conservación del material biológico	23
2.3.2 Preparación de la suspensión micobacteriana de trabajo	24
2.4 Estandarización del método de análisis de ácidos micólicos	25
2.4.1 Análisis de ácidos micólicos	25
2.4.1.1 Saponificación de micolatos y extracción de ácidos micólicos	25
2.4.1.2 Derivatización de los ácidos micólicos	26
2.4.1.3 Análisis cromatográfico	26
2.4.2 Evaluación de la precisión del método de análisis	27
2.5 Determinación de la cinética de crecimiento en presencia y en ausencia de antifímicos por el método de cuenta en placa y por CLAR	27
2.5.1 Preparación de medios de cultivo	29
2.5.1.1 Preparación del medio de cultivo Middelbrook 7H9	29
2.5.1.2 Preparación de los tubos con medio de cultivo Middelbrook 7H9 con isoniacida	29
2.5.1.3 Preparación del los tubos con medio de cultivo Middelbrook 7H9 con estreptomina	30
2.5.1.4 Preparación del agar Middelbrook 7H10	30
2.5.2 Obtención de las muestras	31
2.5.3 Determinación de las UFC/ml por el método de cuenta en placa	31
2.5.4 Análisis de ácidos micólicos	32
2.6 Evaluación de resultados	32
2.6.1 Correlación entre el ATAM y las UFC/ml	33
2.6.2 Correlación de la cinética de crecimiento micobacteriano evaluadas por CLAR y por cuenta en placa	33

Capítulo**Página**

2.6.3	Comparación de las cinéticas de crecimiento micobacteriano en presencia y en ausencia de antifímico	34
2.7	Determinación de la sensibilidad por el método indirecto de proporción	34
2.7.1	Preparación de medios de cultivo	34
2.7.1.1	Preparación de la solución concentrada de isoniacida	34
2.7.1.2	Preparación de la solución concentrada de estreptomicina	35
2.7.1.3	Preparación del agar Middelbrook 7H10 con antifímico	35
2.7.2	Inoculación del medio de cultivo	35
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1	Elementos de bioseguridad	37
3.2	Preparación del material biológico	37
3.3	Estandarización del método de análisis de ácidos micólicos	37
3.3.1	Análisis de los ácidos micólicos	37
3.3.2	Evaluación de la reproducibilidad del análisis de ácidos micólicos	38
3.4	Cinética de crecimiento en ausencia de antifímico por cuenta en placa y por CLAR	40
3.5	Cinética de crecimiento en presencia de antifímico por cuenta en placa y por CLAR	43
3.6	Determinación de pruebas de sensibilidad por el método indirecto de proporción	45
4	CONCLUSIONES	46

Capítulo	Página
RESUMEN	49
BIBLIOGRAFÍA	51



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Historia de la tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Es una patología antigua que se ha encontrado en esqueletos de la edad de piedra y en huesos de algunas momias egipcias (1).

La naturaleza infecciosa de la tuberculosis se estableció en los experimentos dirigidos por Jean Antoine Villemin entre 1865 y 1868 (2). En 1882, Robert Koch anunció a la sociedad de fisiología de Berlín que había cultivado el bacilo de la tuberculosis y describió un método de tinción para el microorganismo, mismo que posteriormente modificó Ehrlich. El método moderno de tinción es en esencia el de Ehrlich aunque lleva los nombres de Zhiel y Neelsen. La micobacteria ha sido objeto de innumerables estudios a partir de entonces (2).

1.2 Características de *Mycobacterium tuberculosis*

1.2.1 Características taxonómicas

Mycobacterium tuberculosis corresponde al orden I, *Actinomycetales*; Familia II, *Mycobacteriaceae*; Género I, *Mycobacterium* (3).

El nombre del género *Mycobacterium* fue asignado por Lehmann y Neumann en 1896 en base a la apariencia de crecimiento de las micobacterias, similar al de los hongos cuando se desarrollan como películas sobre caldo nutritivo (3). *Mycobacterium tuberculosis* es un bacilo aerobio, no esporulado, inmóvil y mide de 1 a 4 μm de ancho.

Su morfología varía desde células pequeñas, casi cocoides, hasta filamentos largos de células que pueden presentar la forma parecida a la de un micelio.

La característica mejor conocida del género *Mycobacterium* es la capacidad de las células de resistir la decoloración con ácidos diluidos (HCl al 3%) después de teñidas con fucsina fenicada. Esta propiedad se denomina ácido-alcohol resistencia y se presenta también en otros géneros como *Nocardia* y *Corynebacterium*. La ácido-alcohol resistencia se explica por un principio de barrera lipídica: la fucsina se une y forma complejos con los residuos de ácidos micólicos presentes en la pared celular, que incrementan el carácter hidrofóbico de la micobacteria e impiden la salida de la fucsina fenicada. La integridad de la célula es esencial para que esta característica se manifieste

(2). Los bacilos tuberculosos son difíciles de teñir con tinción de Gram; aunque habitualmente se consideran Gram positivos, la tinción es irregular y pobre debido a la falta de penetración del colorante a través de la pared celular. Así, la tinción de Gram no es válida para la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes en muestras clínicas (2 y 3).

1.2.2 Metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis*

Comparada con la mayoría de las bacterias, *Mycobacterium tuberculosis* crece muy lentamente, tiene un tiempo de generación de 16 a 20 hr en un cultivo *in vitro* (2).

Cubre sus requerimientos de energía por la oxidación completa de glucosa o glicerol a dióxido de carbono y agua. El glicerol es la fuente de carbono y energía preferida y no puede ser sustituido por otros alcoholes (4 y 5).

La asparagina es la mejor fuente de nitrógeno para su crecimiento. El ácido glutámico puede ser empleado pero en un intervalo de concentraciones muy limitado. La histidina, el ácido aspártico y la prolina pueden ser utilizados pero la velocidad de crecimiento es menor. Aunque están presentes las vías de Embden Meyerhof (EM) y de

pentosa fosfato, la primera se usa predominantemente EM (4 y 5). Diversos elementos son requeridos para su cultivos, tales como el zinc y el hierro. Dada la naturaleza insoluble del Fe +3 a pH fisiológico, la micobacteria cuenta con dos agentes quelantes para su transporte hacia la célula: exoquelina, que es un compuesto extracelular hidrosoluble que sustrae el Fe +3 de la ferritina y la micobactina, una molécula lipófila localizada en la envoltura celular cerca de la membrana citoplasmática (4 y 5).

Mycobacterium tuberculosis es capaz de asimilar una amplia variedad de metabolitos de los tejidos del huésped para su desarrollo. Algunos de los substratos empleados por la micobacteria se muestran en la figura 1.

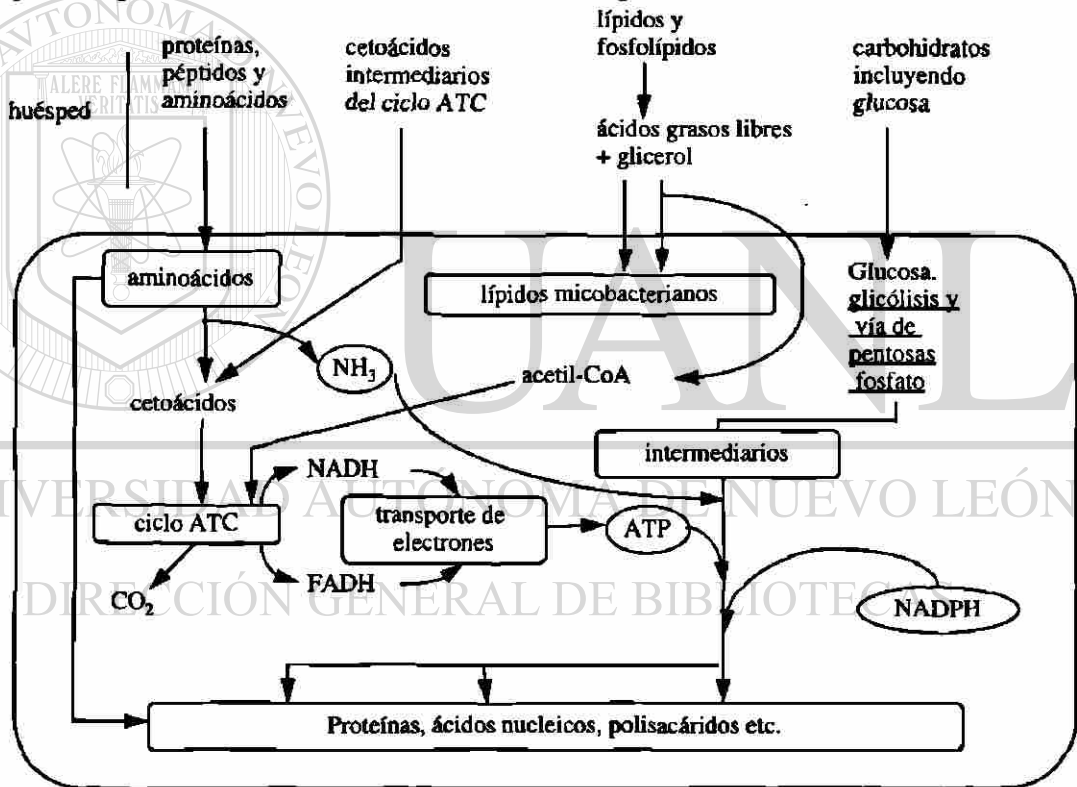


Figura 1. Metabolismo de *Mycobacterium tuberculosis*. Metabolismo de las diferentes fuentes de carbono del huésped por las micobacterias intracelulares. Además, las micobacterias pueden asimilar purinas y pirimidinas y emplearlas para la biosíntesis de ácidos nucleicos. ATC: ácido tricarboxílico. Tomado de Bloom, B.R.(4).

1.2.3 Componentes de *Mycobacterium tuberculosis*

1.2.3.1 Envoltura celular

Los componentes de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* están bien determinados. La membrana celular contiene el material citoplasmático y sus componentes lipídicos son anfipáticos, tales como los fosfolípidos y los fosfatidilinositolmanósidos, que incluyen cadenas de ácidos grasos, usualmente de 16 a 18 carbonos de longitud (2, 4 y 5).

La pared celular está formada de un péptidoglicano unido a un arabinogalactano. El arabinogalactano forma ésteres con ácidos grasos de alto peso molecular denominados ácidos micólicos (figura 2).

El micolato de péptidoglicano-arabinogalactano forma el esqueleto de la pared celular. Asociado con éste hay una gran cantidad de lípidos, glicolípidos y algunas proteínas (4 y 5).

Los lípidos corresponden aproximadamente al 60 % del peso seco de la pared y confieren al microorganismo propiedades que le permiten resistir condiciones ambientales adversas (4 y 5).

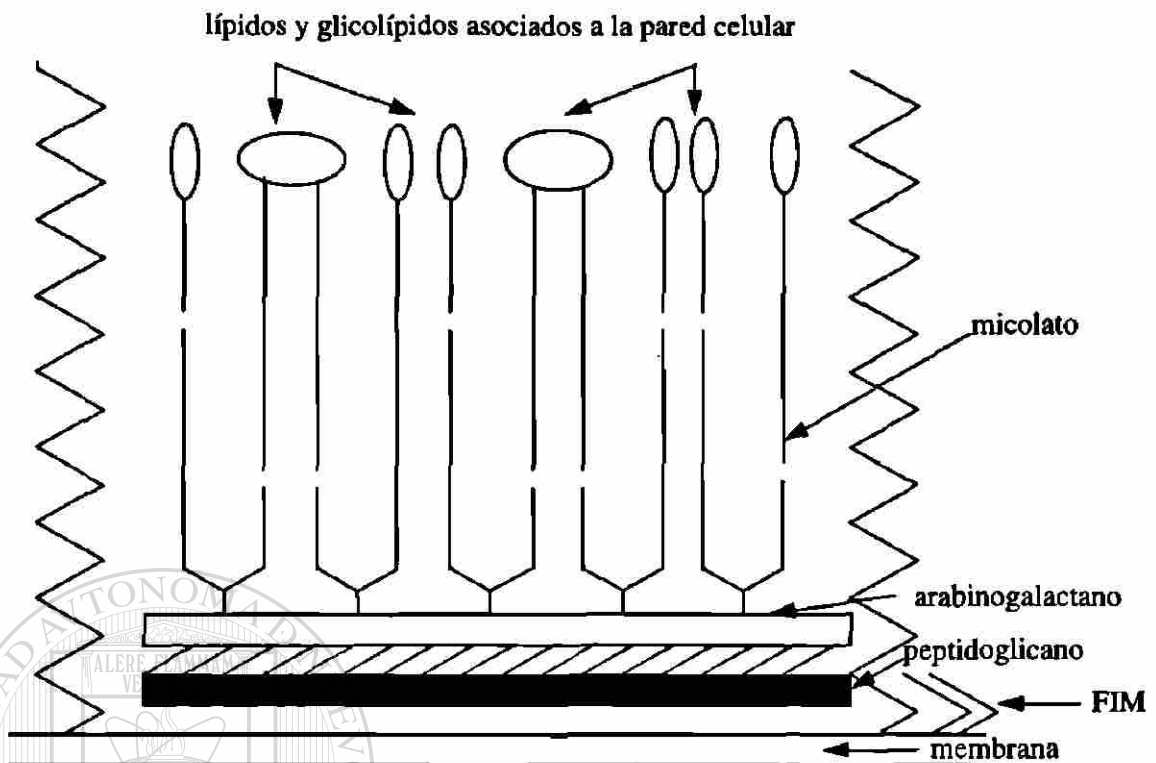


Figura 2. Modelo de la estructura de la envoltura micobacteriana. La figura muestra el arreglo de la membrana celular, los peptidoglicanos y los arabinogalactanos unidos covalentemente. Además, se muestran los fosfatidilinositolmanósidos (FIM). Adaptado de Bloom, B.R. (4).

1.2.3.2 Ácidos micólicos

Los ácidos micólicos son β -hidroxiácidos de 70 a 90 átomos de carbono. Son complejos, largos (hasta 56 átomos de carbono de longitud) y pueden contener grupos funcionales con oxígeno. Los ácidos micólicos tienen una cadena α -saturada de 24 a 26 átomos de carbono (figura 3). Ácidos análogos son elaborados por todas las micobacterias y por el género *Nocardia* y *Corynebacterium*, en cada género son producidos con características especiales (1, 4 y 5).

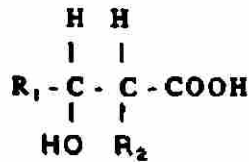


Figura 3. Estructura de los ácidos micólicos. R_1, R_2 , hidrocarburos de cadena larga.

Los ácidos micólicos proporcionan características taxonómicas a las diferentes micobacterias. Se pueden encontrar unidos a arabinogalactanos, libres y como 6,6'-dimicolato de trealosa (factor cuerda). El factor cuerda (figura 4) se denomina así por su asociación con la estructura en forma de cuerda de las microcolonias de micobacterias.

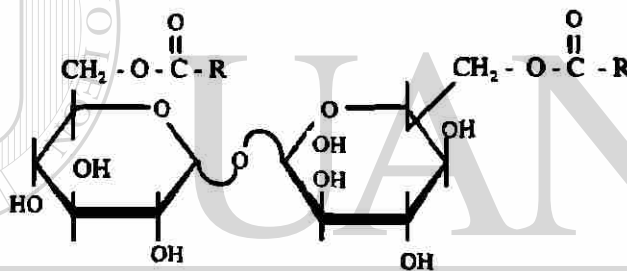


Figura 4. Estructura del factor cuerda, 6, 6'-dimicolato de trealosa, $\text{RCO} = \text{micolil}$.

1.3 Tuberculosis

1.3.1 Patogenicidad de *Mycobacterium tuberculosis*

La patogenicidad de *Mycobacterium tuberculosis* depende inicialmente de la capacidad de estos microorganismos para resistir los mecanismos naturales de defensa

del huésped infectado. En vista de esta resistencia, el huésped desarrolla inmunidad celular para responder a la presencia de estos microorganismos e inhibir la replicación de las micobacterias (1, 2, 4 y 5).

Mycobacterium tuberculosis no produce exotoxinas ni endotoxinas. Ningún antígeno o mecanismo puede explicar la virulencia del microorganismo. Algunas características que se asocian habitualmente con la capacidad de producir una enfermedad progresiva por cepas virulentas son (1, 4 y 5):

- **Habilidad para solubilizar el Fe^{+3} :** La micobacteria depende de la presencia de cantidades suficientes de Fe^{+3} para lo cual produce exoquelina y micobactina (figura 5). La exoquelina remueve el Fe^{+3} de la ferritina y forma un complejo, éste difunde libremente y transfiere rápidamente el Fe^{+3} quelado dentro de la célula micobacteriana. La micobactina toma el Fe^{+3} de la transferrina logrando así un suministro ideal.
- **Alta producción de sulfolípidos:** Los sulfolípidos se componen de varios ácidos grasos (no de ácidos micólicos) unidos a una molécula de trealosa sulfatada. Éstos facilitan la infección al inhibir la fusión fagosoma-lisosoma, bloqueando con ello la respuesta inmune del huésped.
- **Requerimientos de oxígeno:** La micobacteria es estrictamente aerobia, y dada la alta tensión de O_2 en el pulmón es éste su lugar ideal de desarrollo.
- **Aumento en la producción de catalasa:** Esta enzima actúa sobre el peróxido de hidrógeno que es producido por células fagocíticas y que es un factor importante para matar las bacterias ingeridas.

Ninguno de los factores mencionados anteriormente puede definir completamente la patogenicidad del microorganismo.

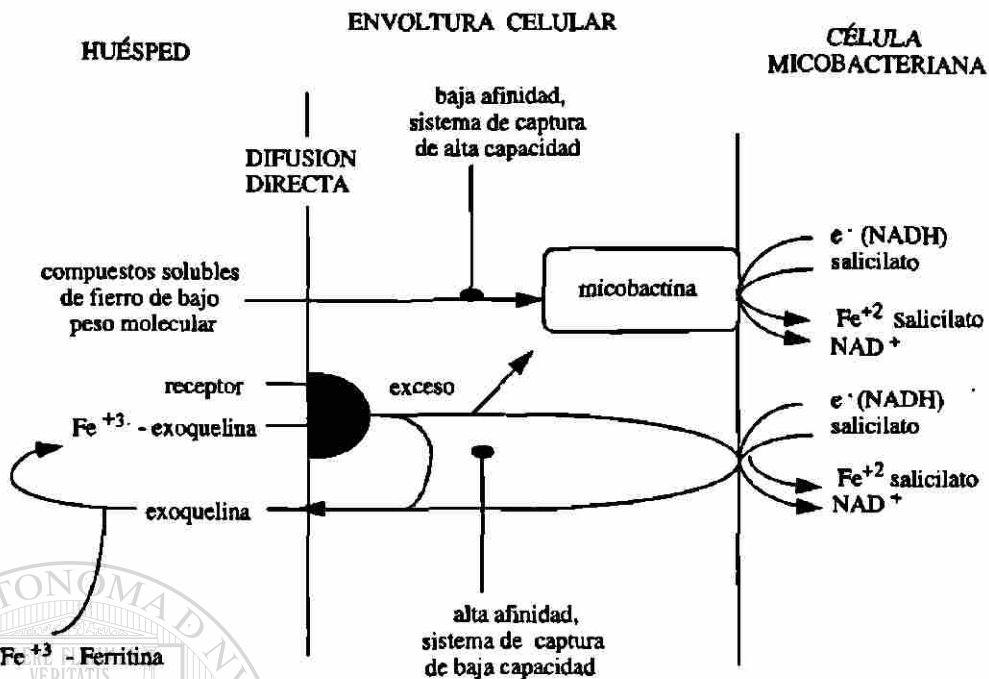


Figura 5. Mecanismo de captura de Fe^{+3} en la micobacteria mediado por exoquelinas y micobactinas. Tomado del Bloom, B.R. (4).

1.3.2 Tuberculosis clínica

La tuberculosis pulmonar se adquiere por inhalación de gotitas de expectoración suspendidas en el aire expulsadas por un enfermo al toser o estornudar. Estas gotitas son de tamaño aproximado de $5 \mu m$ y pueden contener hasta dos bacilos tuberculosos cada una (1, 2, 4 y 5).

Después de ser inhalados, los microorganismos virulentos llegan a los espacios alveolares y son fagocitados por macrófagos. Dentro de los macrófagos, las bacterias se multiplican con una reacción del huésped mínima, posteriormente el bacilo se disemina hacia los ganglios regionales en el hilo del pulmón y luego hacia el torrente circulatorio, el cual lleva los microorganismos a casi todo el organismo. Se produce entonces la diseminación linfohematógena asintomática de la infección primaria. La mayoría de los bacilos circulantes son eliminados por los órganos reticuloendoteliales (1, 2, 4 y 5).

En los ápices pulmonares y en menor proporción en los riñones, áreas esqueléticas vasculares y ganglios linfáticos continúa la multiplicación bacteriana. Después de 4 semanas aproximadamente de la infección, el desarrollo de la inmunidad celular y la hipersensibilidad tuberculínica alteran el curso de la infección. Los macrófagos activados limitan aún más el crecimiento bacteriano y reducen el número de microorganismos en los focos primarios y metastásicos (1, 2, 4 y 5).

La respuesta inflamatoria no específica se torna granulomatosa y hay formación de *tubérculos, los cuales son agregados de macrófagos agrandados (células epitelioides)*. Este agregado está rodeado de fibroblastos, macrófagos y linfocitos. Con frecuencia, la región central sufre necrosis caseosa y se produce un tubérculo blando (1, 2, 4 y 5). Después del desarrollo de la hipersensibilidad, la lesión se torna inactiva y asintomática en la mayoría de los pacientes (90 %).

La infección inicial con *Mycobacterium tuberculosis* se denomina tuberculosis primaria. La enfermedad posterior, ya sea a partir de fuente exógena o por reactivación de una infección primaria, se conoce como tuberculosis secundaria o reinfección (1- 4).

Si la infección tuberculosa inicial no cede, se produce una enfermedad secundaria a pesar de la inmunidad celular adquirida. La enfermedad puede evolucionar a una enfermedad clínica en individuos muy jóvenes y en adultos inmunocomprometidos. La progresión puede ser en el sitio de la lesión primaria o en sitios alejados, donde los bacilos llegaron durante la diseminación hematógica temprana (1, 4 y 5).

Las lesiones se localizan generalmente en los ápices de los pulmones. La tuberculosis pulmonar apical se manifiesta en los primeros dos años de la infección primaria en el 5% de los pacientes. La enfermedad puede evolucionar décadas después, al disminuir la resistencia del individuo a la enfermedad. Por lo tanto, los focos inactivos que alojan microorganismos viables, son un riesgo potencial durante toda la vida de un individuo (1, 2, 4-6).

1.3.3 Epidemiología de la tuberculosis

El desarrollo de la enfermedad clínica está asociada generalmente a padecimientos que reducen la habilidad del huésped para responder a la tuberculosis; tales como la silicosis, diabetes y enfermedades asociadas con inmunosupresión como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y el tratamiento con corticosteroides y otras drogas (7-16).

La pandemia del SIDA y la evidencia de su relación con tuberculosis ha generado un marcado incremento en la incidencia de la tuberculosis en algunos países cambiando radicalmente su epidemiología. Debido a la habilidad del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) de destruir el sistema inmune, la infección por este virus ha emergido como el factor de riesgo más importante para la progresión de la infección a la enfermedad clínica (7 y 16) y ha generado una crisis de primera magnitud en salud pública. Se ha estimado que desde el inicio de la pandemia del SIDA, más de 5 millones de personas alrededor del mundo están infectadas de tuberculosis y SIDA; una gran mayoría de ellos vive en África (Figura 6).



Figura 6. Distribución global estimada de adultos infectados con SIDA y tuberculosis a mitad de 1993. Cifra por 1000. Adaptado de Bloom, B.R. (4).

1.4 Métodos de laboratorio para el diagnóstico de la tuberculosis

Ya que *Mycobacterium tuberculosis* es una micobacteria altamente infecciosa, para el manejo del microorganismo y de muestras que potencialmente lo contengan, deben seguirse las recomendaciones de bioseguridad de nivel 2 (1-6, 17-22). Este nivel de bioseguridad involucra el empleo adecuado de una campana de seguridad biológica, uso de luz ultravioleta, uso de desinfectantes y empleo de ropa protectora (guantes, cubrebocas, bata exclusiva para el área de trabajo). Todo el trabajo de laboratorio debe ser realizado por personal en buen estado de salud y capacitado para el trabajo de micobacteriología. Los métodos que se emplean para el estudio de la tuberculosis son: tinción de Zhiel Neelsen, cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*, método radiométrico, pruebas genéticas, y métodos cromatográficos.

1.4.1 Tinción de Zhiel Neelsen

Para realizar esta tinción, se realiza una preparación de espécimen en portaobjetos.

Se fija al calor y se tiñe con fucsina fenicada por 15 minutos. Posteriormente, se decolora con alcohol-ácido y se tiñe con azul de metileno. Se deja secar la preparación y se observa al microscopio con objetivo de inmersión. Los bacilos ácido-alcohol resistentes aparecen color rojo y el resto de la muestra se tiñe de color azul.

La tinción de Zhiel-Neelsen es un método poco sensible ya que requiere de 10,000 bacilos/ml en la muestra estudiada para la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes en la preparación. Esta tinción fue una herramienta importante en el pasado; sin embargo, la corriente epidemiológica actual ha disminuido su valor diagnóstico. Por lo tanto, el aislamiento e identificación del microorganismo en muestras del paciente es necesario para el diagnóstico definitivo (1-6, 17-22).

1.4.2 Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

Los bacilos tuberculosos pueden crecer en un medio sintético muy simple, pero para el aislamiento a partir de material clínico, es necesario un medio más complejo con una base de huevo o una base de agar-suero. Crecen muy lentamente, incluso en condiciones óptimas y son necesarios 14 a 28 días de incubación a 37°C para observar el crecimiento. En medios líquidos sintéticos, las propiedades hidrófobas de la superficie celular generan un crecimiento laminar en la superficie del medio. Si se agrega al medio líquido un detergente no iónico (tween 80), se obstaculiza la agregación celular y hay crecimiento difuso. La inyección de aire a los cultivos por rotación incrementa notablemente la velocidad de crecimiento y acorta la fase lag (1-6, 17-22).

En México, el medio de cultivo más frecuentemente utilizado es el Lowenstein Jensen (base de huevo). Para la identificación, se realizan pruebas bioquímicas empleando diferentes sustratos y medios de cultivo solidificados con huevo. Éstos medios son preparados especialmente para cada una de las pruebas con las variantes requeridas en cada caso (1-6, 17-22).

1.4.3 Método radiométrico.

El método está disponible comercialmente (*Becton Dickinson*) y emplea un medio de cultivo líquido con ácido palmítico marcado con carbono 14 como sustrato el cual la micobacteria metaboliza y excreta en forma de CO₂ (4 y 23). Este CO₂ marcado se detecta en la atmósfera del cultivo. El crecimiento en este medio puede ser detectado en 1 a 2 semanas, dependiendo del número de bacterias en la muestra. No es específico ya que detecta también el metabolismo de microorganismos contaminantes.

Para la diferenciación del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, este método emplea el p-nitro- α -acetilamino- β -hidroxipropiofenona (NAP) además del ácido

palmítico marcado con carbono y requiere de un tiempo de incubación promedio de 3 días (4 y 23).

El método radiométrico se emplea también para la determinación de la sensibilidad a Isoniacida, rifampicina, etambutol, pirazinamida y estreptomycin. Los resultados se obtienen en un tiempo máximo de 5 días y este método ha dado buenos resultados, si bien tiene la desventaja de ser caro.

1.4.4 Pruebas genéticas

Las pruebas genéticas se basan en el análisis de la presencia de secuencias de genes específicos de la micobacteria. Se han empleado tanto la hibridación de DNA como la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La hibridación de DNA está disponible comercialmente (*AccuProbe*, *Gen-Probe*, *San Diego, Calif.*) y se basa en la habilidad de un ácido nucleico marcado para asociarse con un RNAr bacteriano específico y formar un complejo estable (4 y 23). Este complejo se une al acridino quimioluminiscente y tras la adición de H₂O₂ se mide la

respuesta con un luminómetro. Además hay disponibles otras pruebas para la identificación de *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium gordonae*. El fabricante describe la prueba en cultivos desarrollados en medio sólido o en caldo Middelbrook 7H9 y que no hay interferencia si el cultivo se desarrolla contaminado.

En la técnica de PCR se amplifican las cadenas individuales de DNA blanco empleando una pareja de oligonucleótidos que se aparean con la secuencia blanco flanqueándola. Actúa después una DNA polimerasa en una reacción de varios ciclos (generalmente entre 20 y 30). En esa técnica hay una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de DNA específico sometido al proceso (4 y 24-28).

Una ventaja importante de esta técnica es que puede detectar desde unas pocas bacterias en un espécimen y el diagnóstico se completa el mismo día de la recolección de la muestra (4).

1.4.5 Métodos cromatográficos

La técnica cromatográfica se basa en el análisis de ácidos grasos presentes en la micobacteria. Se emplean tanto la Cromatografía Gas-Líquido (CGL) como la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

La CGL emplea una gas (hidrógeno) como fase móvil para llevar una muestra a través de una columna con una fase estacionaria líquida (OV-17) y separar los componentes del espécimen (23, 29-30). En la CGL los microorganismos se someten a un proceso de saponificación de los lípidos de la pared de la micobacteria, posteriormente el producto se trata con una mezcla BF₃-metanol para formar los ésteres metílicos trifluoroacetilados y estos derivados se extraen con una mezcla hexano-metanol. La muestra se inyecta en un cromatógrafo de gases equipado con un espectrómetro de masas. Ya que la CGL presenta algunas desventajas, tales como el trabajo a altas temperaturas (350 °C) y la descomposición de la muestra, actualmente se emplea más la CLAR.

La CLAR se basa en el análisis de ácidos grasos de cadena larga llamados ácidos micólicos y emplea una fase móvil líquida a alta presión para llevar una muestra a través de una columna empacada con una fase estacionaria en la cual se separan los componentes del espécimen (23, 31-40). Para el análisis por CLAR, se saponifican unos micolatos de peptidoglicano-arabinogalactano que se encuentra en la pared de la micobacteria, posteriormente los ácidos micólicos liberados se extraen y se derivatizan a p-bromofenacil ésteres. La muestra se inyecta en un cromatógrafo de líquidos de alta presión equipado con un detector de UV-VIS. Ya que el perfil cromatográfico de ácidos

micólicos es único en cada especie micobacteriana, este método se emplea en la identificación de micobacterias de importancia médica con una exactitud del 98.6 % (23, 31-40).

1.5 Tratamiento de la tuberculosis

1.5.1 Antifímicos empleados

En el tratamiento de la tuberculosis se emplean antifímicos primarios: Isoniacida, estreptomina, rifampicina y pirazinamida; así como antifímicos secundarios: etionamida, capreomicina, kanamicina, cicloserina, ácido p-aminosalicílico (41-47). Los antifímicos secundarios se emplean sólo cuando se desarrolla resistencia a los antifímicos primarios. Los antifímicos actúan de diferentes maneras en la célula micobacteriana: inhibición de la síntesis de la pared celular, inhibición de la síntesis de proteínas e inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (figura 7).

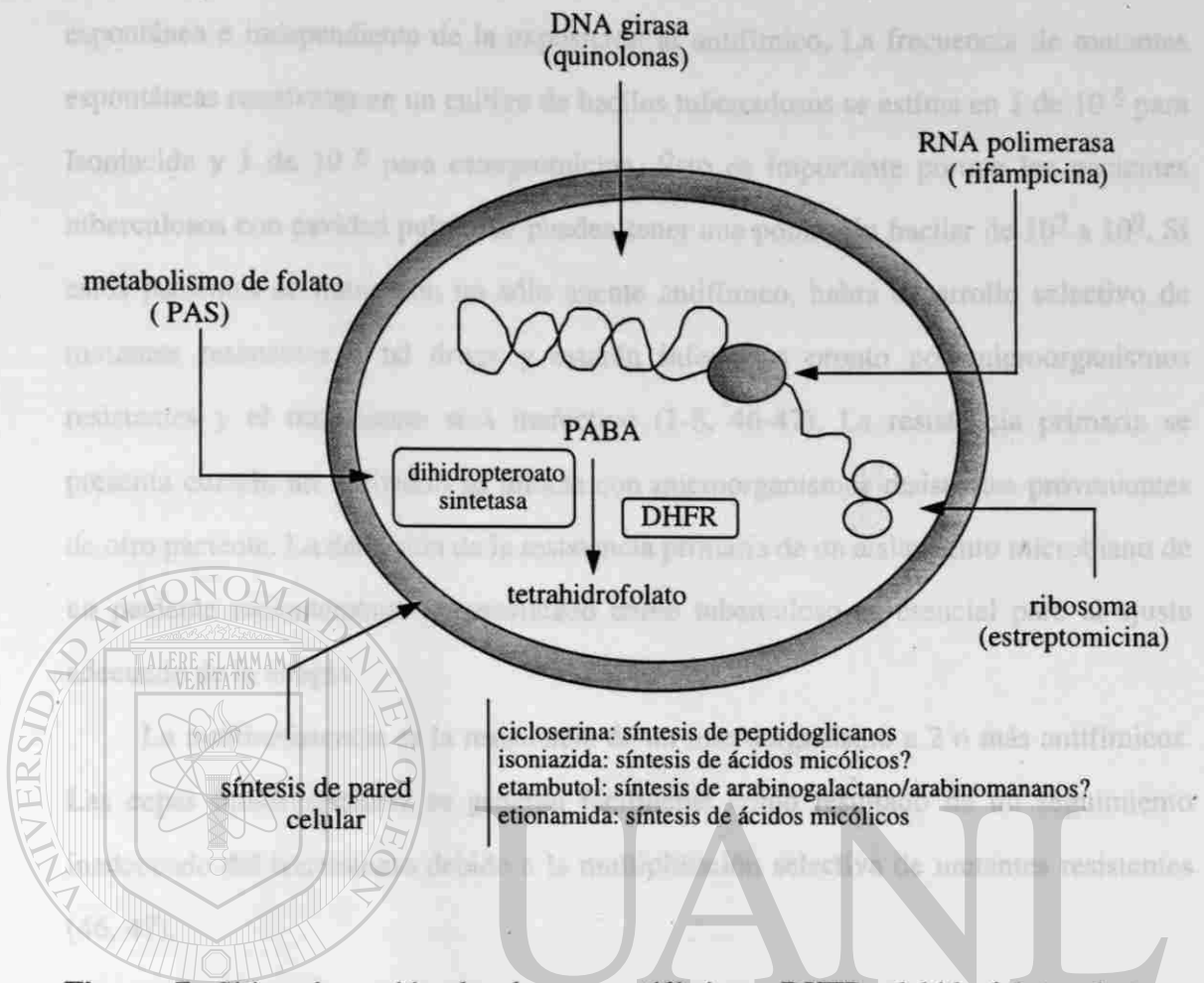


Figura 7. Sitios de acción de algunos antifímicos. DHFR, dehidrofolato reductasa; PABA, ácido p-aminobenzoico; PAS, ácido p-aminosalicílico. Tomada del Bloom, B.R. (4).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.5.2 Sensibilidad y resistencia

Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensibles contienen menos del 1% de la población bacteriana resistente a la droga antituberculosa probada a concentraciones críticas; es decir, concentraciones significativamente mayores que las concentraciones mínimas inhibitorias y extrapolables a dosis terapéuticas (2-6).

Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes presentan una proporción incrementada de mutantes resistentes al antifímico probado, esta resistencia es

espontánea e independiente de la exposición al antifímico. La frecuencia de mutantes espontáneas resistentes en un cultivo de bacilos tuberculosos se estima en 1 de 10^5 para Isoniacida y 1 de 10^6 para estreptomycin. Ésto es importante porque los pacientes tuberculosos con cavidad pulmonar pueden tener una población bacilar de 10^7 a 10^9 . Si estos pacientes se tratan con un sólo agente antifímico, habrá desarrollo selectivo de mutantes resistentes a tal droga y estarán infectados pronto por microorganismos resistentes y el tratamiento será inefectivo (1-5, 46-47). La resistencia primaria se presenta cuando un individuo se infecta con microorganismos resistentes provenientes de otro paciente. La detección de la resistencia primaria de un aislamiento microbiano de un paciente recientemente diagnosticado como tuberculoso es esencial para el ajuste adecuado de la terapia.

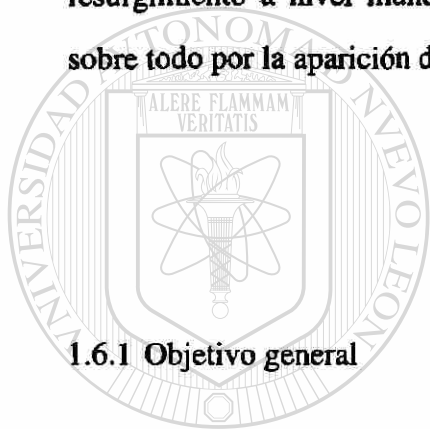
La multiresistencia es la resistencia de un microorganismo a 2 o más antifímicos. Las cepas multiresistentes se generan fácilmente como resultado de un seguimiento inadecuado del tratamiento debido a la multiplicación selectiva de mutantes resistentes (46, 47).

1.5.3 Pruebas de sensibilidad

En el laboratorio de micobacteriología se realizan pruebas para conocer la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* (17-22) empleando el método de proporción, directo o indirecto. Se utiliza agar Middelbrook 7H11 en placas Petri y a éste se incorporan concentraciones críticas de antifímico. Se inoculan con una suspensión de micobacterias cuya turbidez corresponda a la del tubo 1 del nefelómetro de Mc Farland. Además se inocula como control una placa sin antifímico. Posteriormente las placas con y sin antifímico se incuban por 3 semanas a 37°C y se cuentan las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) desarrolladas. El porcentaje de

micobacterias resistentes en la población se reporta en base a la comparación del número de UFC/ml en el medio que contiene el medio con antifímico y la cuenta obtenida en el medio libre de antifímico.

Si se tiene en cuenta que el método indirecto de proporción para la determinación de la sensibilidad requiere de tres semanas para la obtención de resultados, es de gran importancia el desarrollo de métodos que permitan conocer en menor tiempo los patrones de sensibilidad de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y tener un acceso rápido al tratamiento ideal. Ésta búsqueda cobra importancia en la actualidad debido al resurgimiento a nivel mundial de la tuberculosis como problema de salud pública y sobre todo por la aparición de cepas multiresistentes a las drogas.



1.6. Objetivos

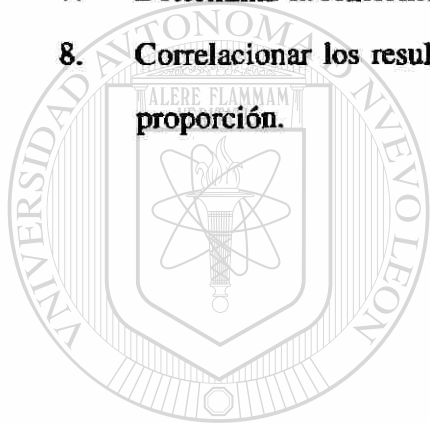
1.6.1 Objetivo general

Desarrollar un método para determinar la sensibilidad a antifímicos de *Mycobacterium tuberculosis* analizando ácidos micólicos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) y compararlo con el método de cuenta en placa y las pruebas de sensibilidad determinadas por el método indirecto de proporción.

1.6.2. Objetivos específicos

1. Estandarizar el método de análisis de ácidos micólicos de *Mycobacterium tuberculosis* por CLAR .
2. Determinar la cinética de crecimiento en ausencia de antifímico por los métodos de cuenta en placa y por CLAR.

3. **Correlacionar las cinéticas de crecimiento en ausencia de antifímico obtenidas por los métodos de cuenta en placa y por CLAR**
4. **Determinar la cinética de crecimiento en presencia de antifímicos por los métodos de cuenta en placa y por CLAR.**
5. **Correlacionar las cinéticas de crecimiento obtenidas en ausencia de antifímicos por los métodos de cuenta en placa y por CLAR.**
6. **Correlacionar las cinéticas de crecimiento obtenidas en presencia y en ausencia de antifímico por los métodos de cuenta en placa y por CLAR.**
7. **Determinar la sensibilidad por el método indirecto de proporción (tradicional).**
8. **Correlacionar los resultados obtenidos por los métodos de CLAR e indirecto de**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Estrategia general

Para el desarrollo del método para determinar la sensibilidad a antifímicos de *Mycobacterium tuberculosis* analizando ácidos micólicos por CLAR y compararlo con el método de cuenta en placa y el método indirecto de proporción se siguió la estrategia general que se muestra en la figura 8.

Se preparó la cepa para tener un suministro constante de microorganismos en la misma fase del desarrollo micobacteriano y se estandarizó el método de análisis de ácidos micólicos, con el fin de identificar los picos correspondientes a los ácidos micólicos y obtener una buena reproducibilidad en el área total de dichos picos cromatográficos. Se realizaron las cinéticas de crecimiento micobacteriano en presencia y ausencia de antifímico evaluando el área total correspondiente a los picos de ácidos micólicos (ATAM) a través del tiempo. Los resultados obtenidos se validaron al comparar dichas cinéticas con sus correspondientes pero evaluadas por cuenta en placa como UFC/ml. Posteriormente, la comparación de las cinéticas de crecimiento micobacteriano en presencia y ausencia de antifímicos determinadas por CLAR permitió conocer a partir de qué día se observa la inhibición del desarrollo micobacteriano y concluir que la cepa empleada es sensible a los antifímicos probados. Esta sensibilidad se ratificó con el método indirecto de proporción.

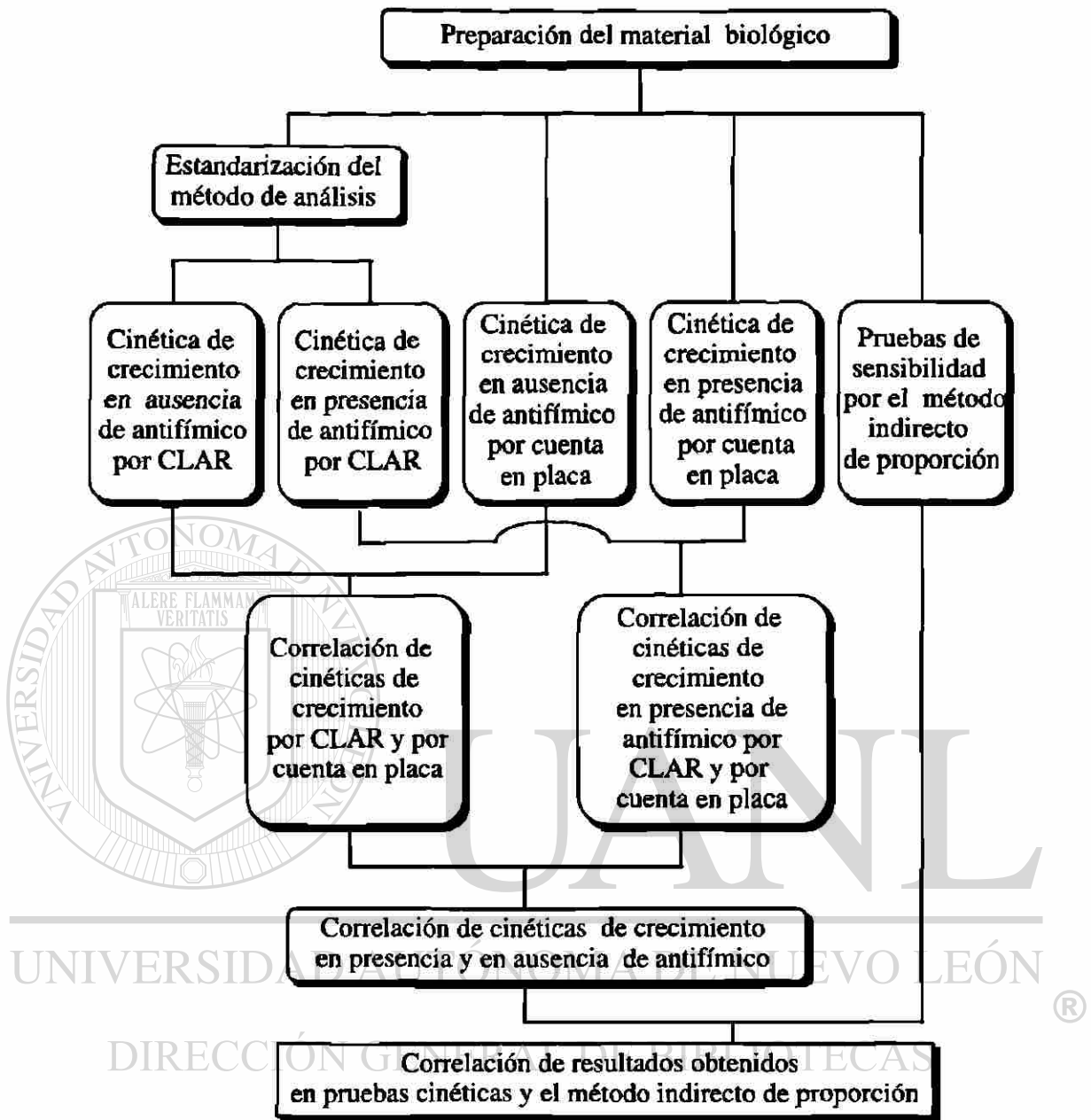


Figura 8. Esquema que muestra la estrategia general seguida para desarrollar un método para determinar la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a antifúngicos analizando ácidos micólicos por CLAR y compararlo con el método de cuenta en placa y el método indirecto de proporción.

2.2 Elementos de bioseguridad

Para el manejo del microorganismo se siguieron las recomendaciones del nivel de bioseguridad 2 (17-22).

Todos los procedimientos que potencialmente generaron aerosoles se realizaron dentro de una campana de seguridad biológica clase II (*Labconco*), la cual estuvo equipada con un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air). El flujo a través de la campana se ajustó para que proporcionara una presión de 0.5 pulgadas de agua. Se trabajó en una sección construida con un sistema de ventilación de una única entrada de aire para mantener la circulación en una sola dirección, de un área limpia a otra menos limpia. Se empleó ropa protectora especial: cubrebocas, bata de laboratorio, bata de laboratorio exclusiva para el área de trabajo y guantes.

Se empleó una solución de formaldehído al 5% (v/v) en agua como agente desinfectante, así como alcohol isopropílico al 70% (v/v) en agua para la desinfección de superficies externas del material de vidrio empleado. Todo del material se desechó en bolsas especiales y se esterilizó antes de descartarse.

Se contó con apoyo médico profesional para verificar el estado de salud de la persona que manejó el microorganismo. Antes de iniciar la parte experimental del proyecto, dicha persona recibió una dosis de intradermoreacción de PPD (Protein Purificate Derivate) presentando una reacción de 4 mm. Se probó nuevamente 3 semanas después del término de la parte experimental y no presentó aumento en la reacción. Se tomó además una placa de Rayos X de tórax como un auxiliar en la verificación de su estado de salud pulmonar.

2.3 Preparación del material biológico

2.3.1 Conservación del material biológico

Para tener un suministro constante de suspensión micobacteriana de trabajo con micobacterias en la misma fase del crecimiento, se preparó el microorganismo como se muestra en la figura 9.

Se empleó la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 que se adquirió especialmente para este trabajo en *American Type Culture Collection, Rockville, MD*.

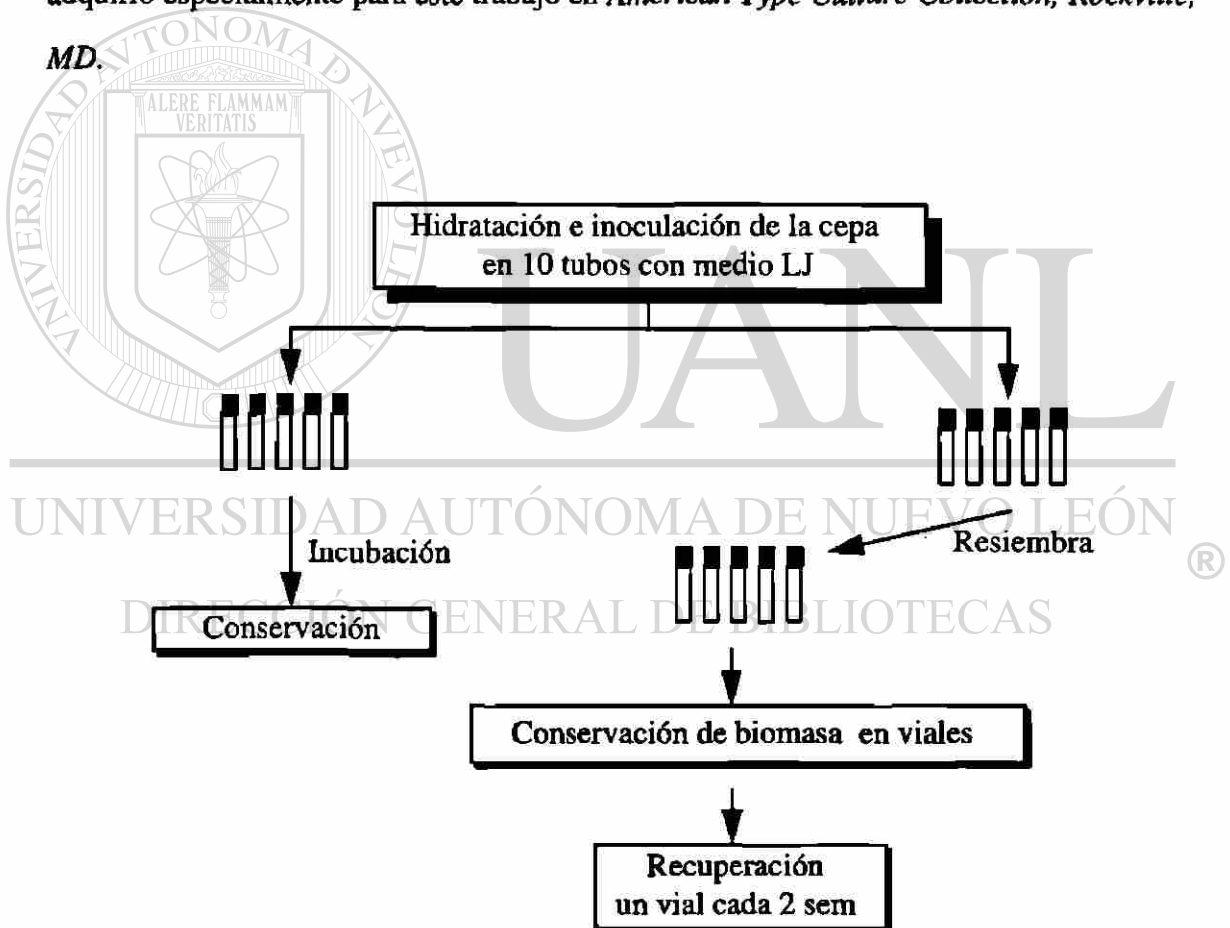


Figura 9. Preparación del material biológico. El esquema muestra la estrategia experimental empleada para preparar el material biológico.

Se hidrató la cepa con 2 ml de solución de NaCl al 0.85% en agua (solución salina). Se inocularon 10 tubos con medio Lowenstein Jensen (LJ, *Bioxon*) con 0.2 ml de la suspensión de micobacterias y se incubaron durante 4 semanas a 35-37°C en una incubadora CI-46 (*American Scientific Products*).

Después de la incubación, los microorganismos de 5 tubos se tomaron de la superficie del medio con un aplicador de madera estéril y se suspendieron en 60 ml de solución de glicerol (*J.T. Baker*) al 50 % (v/v) en solución salina. Se prepararon 30 alícuotas de 2 ml en viales de 15 X 50 mm con tapón de rosca y se congelaron a -20°C en un congelador Cryo-Fridge (*American Scientific Products*) para conservar la cepa.

Los microorganismos de los 5 tubos restantes se resembraron en 5 tubos con medio LJ y se incubaron durante 4 semanas a 35-37°C. Después de esta incubación, se tomaron los microorganismos de los 5 tubos de la superficie del medio con un aplicador estéril y se suspendieron en 80 ml de solución de glicerol al 50 % (v/v) en solución salina. Se prepararon 30 alícuotas de 2 ml en viales de 15 X 50 mm con tapón de rosca y se congelaron a -20°C. Estos viales con microorganismos se emplearon como fuente permanente de micobacterias para la preparación de la suspensión micobacteriana de trabajo.

2.3.2 Preparación de la suspensión micobacteriana de trabajo

Cada dos semanas se descongeló un vial, se sembró en un tubo con medio LJ y se incubó durante 4 semanas a 35-37°C. Con la biomasa obtenida, se preparó una suspensión según el método descrito por P.T. Kent y G.P. Kubica (19). Se añadieron microorganismos con un aplicador de madera estéril a un tubo de 18 X 100 mm con tapón de rosca con 6 perlas de vidrio y 5 ml de solución salina. Se homogeneizó en un vortex por 20 min y se permitió que las partículas gruesas sedimentaran. Se separó el sobrenadante y se trasladó a un tubo estéril de 13 X 100 mm. Se ajustó la absorbancia a

540 nm de esta suspensión a la correspondiente al tubo 1 del Nefelómetro de MacFarland con solución salina, a esta suspensión se le denominó suspensión micobacteriana de trabajo y se preparó recientemente tantas veces como fue necesario durante todo el trabajo.

2.4 Estandarización del método de análisis de los ácidos micólicos

2.4.1 Análisis de los ácidos micólicos

Se siguió una modificación del procedimiento descrito por W.R. Butler y J.O. Kilburn (34). El método de análisis comprendió las siguientes etapas: una saponificación de ésteres, extracción y derivatización de ácidos micólicos y análisis por CLAR de estos derivados.

2.4.1.1 Saponificación de ésteres y extracción de ácidos micólicos

Los ácidos micólicos están unidos covalentemente a la pared de la micobacteria, por lo tanto fue necesario realizar una saponificación y posterior extracción de los mismos.

Se preparó 1 tubo de 13 X 100 mm con tapón de rosca con 1 ml de la suspensión micobacteriana de trabajo preparada como se describió anteriormente, se añadieron 1.5 ml de solución de KOH (*J.T. Baker*) al 50 % en una mezcla metanol (*J.T. Baker*)-agua (75:25) y se mezcló por inversión suave. El tubo se calentó 1 hora en un autoclave a 121°C y se enfrió a temperatura ambiente. Se añadieron 1.35 ml de HCl al 50 % v/v en agua y se agitó suavemente por inversión. Posteriormente, se añadió 1 ml de CH₂Cl₂ grado HPLC (*Mallinckrodt*) y se agitó el tubo vigorosamente. Se separó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo 2 veces más con 1 ml de CH₂Cl₂ grado HPLC en cada extracción. Los extractos orgánicos se recolectaron en un tubo de 13 X 100 mm con tapón de rosca. El extracto orgánico se llevó a sequedad calentando a 60°C en un bloque de

calentamiento (*Thermolyne, Type 17600*) y con corriente de N_2 . El tubo se enfrió a temperatura ambiente para llevar a cabo la reacción de derivatización.

2.4.1.2 Derivatización de los ácidos micólicos

Después de extraer los ácidos micólicos liberados por saponificación, se derivatizaron mediante la esterificación con un reactivo aromático (p-bromofenacil-8) para formar un derivado con un máximo de absorción a 260 nm que dé señal a un detector de UV en el sistema cromatográfico (48-50).

Al tubo del punto anterior se añadió 0.1 ml de solución de $KHCO_3$ (*JT Baker*) 0.2 M en agua. Se calentó a $60^\circ C$ en un bloque de calentamiento y se llevó a sequedad con corriente de N_2 . Posteriormente se añadió 1 ml de CH_2Cl_2 grado HPLC y 50 μl de reactivo p-bromofenacil-8 (*Pierce Chemical Company, Rockford, IL*), se cerró perfectamente el tubo. Se calentó a $85^\circ C$ durante 20 min, se enfrió a temperatura ambiente y se añadió 1 ml de una solución al 50 % (v/v) de HCl en una mezcla metanol - agua (1:1). El tubo se mezcló vigorosamente y se separó la fase orgánica. La fase acuosa se extrajo 2 veces más con 0.5 ml de CH_2Cl_2 grado HPLC. Los extractos orgánicos se recolectaron en un tubo de microcentrífuga graduados de 2 ml (*Cel Associates, Inc*). El extracto orgánico se evaporó a sequedad calentando a $60^\circ C$ en un bloque de calentamiento y con corriente de N_2 . El tubo se enfrió a temperatura ambiente para su posterior análisis cromatográfico.

2.4.1.3 Análisis cromatográfico

El residuo seco de ácidos micólicos derivatizados se disolvió en 70 μl de CH_2Cl_2 frío grado HPLC, para minimizar la evaporación del solvente, se centrifugó a 16000 g (14000 rpm) en una microcentrífuga Eppendorf (*Brinkmann Instruments, Inc*) durante 3 s y se inyectó inmediatamente en un Cromatógrafo de Líquidos System Gold (*Beckman Instruments, Inc. Berkley Calif*). Se empleó una columna analítica de fase reversa

Ultrasphere-ODS XL de 70 X 4.6 mm (*Beckman*) y un detector UV-VIS de arreglo de diodos 168 System Gold (*Beckman*) a una longitud de onda de 260 nm. Se utilizó un sistema de elución de gradiente con un eluyente A (metanol) y un eluyente B (CH_2Cl_2 grado HPLC): 2 % de B durante 1 min, 20 % de B en 1 min, 65 % de B en 9 min y 2 % de B en 2 min, a un flujo de 2.5 ml/min. Se mantuvieron estas condiciones durante un mínimo de 5 min antes de la siguiente inyección. Los eluyentes fueron filtrados y desgasificados a vacío antes de su uso.

Se identificaron los picos de tiempo de retención entre 7 y 10 min como correspondientes a los ácidos micólicos y se determinó el ATAM a cada uno de los cromatogramas obtenidos.

2.4.2 Evaluación de la reproducibilidad del método de análisis

Para determinar si era posible analizar de manera reproducible los ácidos micólicos, se analizaron 4 muestras de 1 ml de suspensión micobacteriana de trabajo. Las muestras se saponificaron, se extrajeron y derivatizaron los ácidos micólicos, y se realizó el análisis cromatográfico. De cada uno de los cromatogramas obtenidos, se calculó el ATAM y con estos valores, se determinó el coeficiente de variación.

2.5 Determinación de la cinética de crecimiento en presencia y en ausencia de antifímico por el método de cuenta en placa y por CLAR

Para determinar la cinética de crecimiento en presencia y en ausencia de antifímico por el método de cuenta en placa y por CLAR se siguió la estrategia experimental que se muestra en la figura 10.

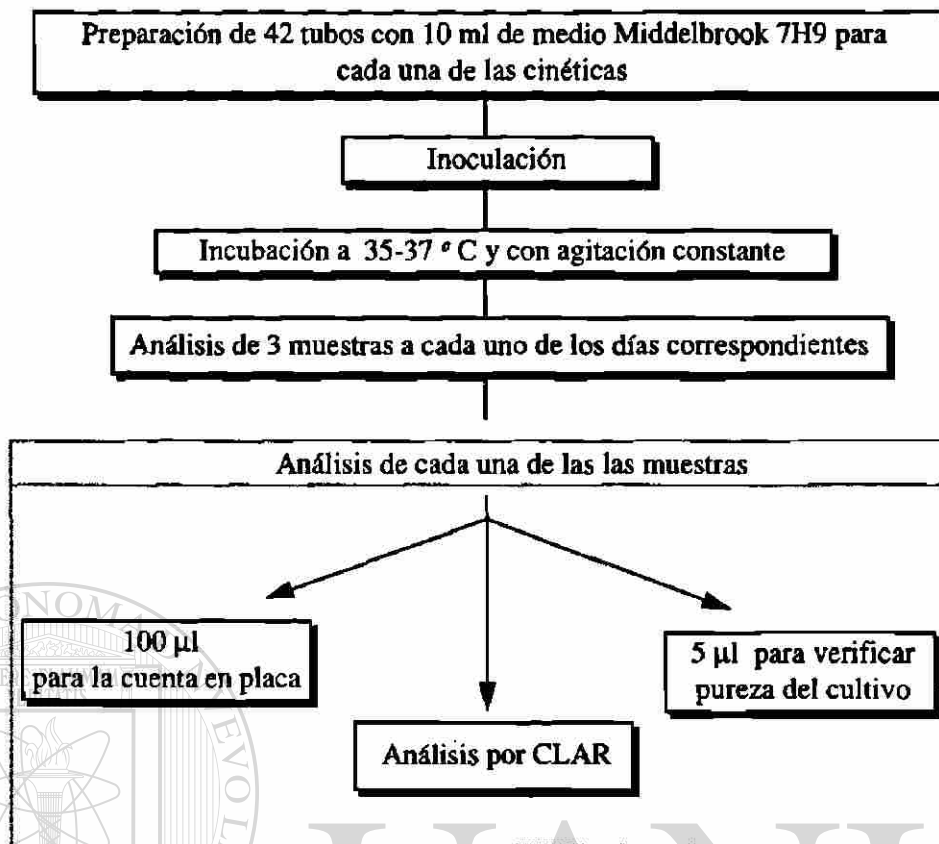


Figura 10. Esquema que muestra la obtención, manejo y análisis de las muestras en los estudios cinéticos.

Se determinó la cinética de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en presencia y en ausencia de antifímico evaluando el ATAM por CLAR a través del tiempo para determinar la posibilidad de detectar la inhibición del crecimiento del microorganismo en presencia de antifímico. Asimismo, se determinó la cinética de crecimiento por cuenta en placa para validar el método cromatográfico y además correlacionar el ATAM con las UFC/ml.

2.5.1 Preparación de medios de cultivo

Para determinar la cinética de crecimiento por CLAR, se empleó el medio líquido Middelbrook 7H9 (*Becton Dickinson*) ya que sus componentes son muy similares a los del medio de cultivo semisólido empleado para las pruebas de sensibilidad tradicionales (Middelbrook 7H10).

Para determinar la cinética de crecimiento por el método de cuenta en placa se utilizó el mismo medio empleado en las pruebas de sensibilidad tradicionales.

2.5.1.1 Preparación del medio de cultivo Middelbrook 7H9

Se preparó el medio de cultivo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (*Becton Dickinson Microbiology Systems*). Se suspendieron 4.7 g de medio en polvo Middelbrook 7H9 en 900 ml de solución de tween 80 al 0.2 % (v/v) en agua y se hicieron alícuotas de 180 ml en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 10 min y se enfrió a 45°C. Se añadieron asepticamente 20 ml de enriquecimiento Middelbrook ADC (*Becton Dickinson Microbiology Systems*). El medio se fraccionó en tubos estériles de 24 X 100 mm en cantidades de 10 ml y se incubó durante 24 hr a 35-37°C para verificar esterilidad. Los tubos que no presentaron turbidez se aceptaron para su empleo en las pruebas cinéticas de crecimiento.

2.5.1.2 Preparación de los tubos con medio Middelbrook 7H9 con Isoniacida

Se pesaron 100 mg de Isoniacida estéril en polvo de potencia 1000 mg/g (*Sigma Chemical Company*), se disolvieron en agua destilada estéril y se aforó a 100 ml. Se tomó 1 ml de esta solución, se diluyó en agua destilada estéril y se aforó a 10 ml. Esta dilución generó una solución de concentración 100 µg/ml.

Por otra parte, en un matraz Erlenmeyer se prepararon 499 ml de medio de cultivo Middelbrook 7H9 como se describió anteriormente (2.5.1.1.) y se añadió 1 ml de la

solución de Isoniacida de concentración 100 µg/ml. La concentración final de Isoniacida en el medio de cultivo fue de 0.2 µg/ml. El medio de cultivo se fraccionó en volúmenes de 10 ml en tubos de 24 X 100 mm estériles. Se incubaron 24 hr a 35-37°C para verificar esterilidad. Los tubos que no presentaron turbidez se consideraron aceptables para su empleo en las pruebas cinéticas de crecimiento.

2.5.1.3 Preparación de los tubos con medio de cultivo Middelbrook 7H9 con estreptomicina

Se pesaron 125 mg de sulfato de dihidroestreptomicina estéril en polvo de potencia 800 mg/g (*Sigma Chemical Company*), se disolvieron en agua destilada estéril y se aforó a 100 ml. Por otra parte, en un matraz Erlenmeyer se prepararon 499 ml de medio de cultivo Middelbrook 7H9 como se describió anteriormente (2.5.1.1.) y se añadió a este medio 1 ml de la solución de estreptomicina preparada anteriormente. La concentración final de estreptomicina en el medio de cultivo fue de 2 µg/ml.

El medio de cultivo se fraccionó en volúmenes de 10 ml en tubos de 24 X 100 mm estériles. Se incubaron a 35-37 °C durante 24 hr para verificar esterilidad. Los tubos que no presentaron turbidez se aceptaron para su empleo en las pruebas cinéticas de crecimiento.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.5.1.4 Preparación del agar Middelbrook 7H10

Se siguió el método descrito por Kent (19). Se prepararon fracciones de 180 ml de medio de cultivo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (*Becton Dickinson, Microbiology Systems*). Se pesaron 3.6 g de agar Middelbrook 7H10 en polvo y se suspendió en 180 ml de agua destilada. Se esterilizó en autoclave por 10 min a 121°C y se enfrió el medio a 56°C en baño de agua y se añadieron 20 ml de enriquecimiento Middelbrook ADC. El agar se vació en placas Petri divididas en cuadrantes en cantidades de 5 ml por cuadrante, se dejaron enfriar y se permitió al agar solidificar. Las placas se

incubaron a 35-37°C durante 24 hr para verificar esterilidad. Las placas que no presentaron colonias se aceptaron para su empleo en las pruebas cinéticas de crecimiento.

2.5.2 Obtención de las muestras

Para cada uno de los estudios cinéticos en ausencia y presencia de cada uno de los antifímicos, se prepararon 42 tubos como se describió anteriormente (2.5.1.1., 2.5.1.2. y 2.5.1.3). Los tubos se inocularon con 10 µl de suspensión micobacteriana de trabajo y se incubaron a 35-37°C en agitación constante a 13 rpm en un agitador (*Laboratory Rotator, Modelo Glas-Col*). Se retiraron 3 tubos de la incubación a los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26 y 29, siempre a la misma hora.

2.5.3 Determinación de las UFC/ml por el método de cuenta en placa

Cada día, inmediatamente después de sacar los tubos de la incubadora, se agitaron en un vortex durante 15 minutos y se emplearon 100 µl de suspensión micobacteriana para preparar diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. De cada dilución se sembró 0.1 ml en una placa Petri con agar Middelbrook 7H10. Las placas se incubaron a 35-37°C por cuatro semanas. Después de esta incubación, se contaron las UFC/ml desarrolladas.

Se emplearon además 5 µl de suspensión micobacteriana para realizar una preparación en portaobjetos y teñirla por el método de Zhiel Neelsen (3) para verificar la pureza del cultivo. Los tubos se consideraron aceptables si en la preparación aparecían solamente bacilos ácido-alcohol resistentes.

Los tubos con el resto del crecimiento micobacteriano se congelaron a -20°C para su posterior análisis.

2.5.4 Análisis de ácidos micólicos

Se empleó el método descrito anteriormente (2.4.1.), modificado para un volumen de 10 ml. A cada una de las muestras de los estudios cinéticos se añadieron 15 ml de solución de KOH al 50 % en una mezcla metanol-agua (75:25) y se agitaron los tubos suavemente por inversión. Se calentaron 1 hora en un autoclave a 121°C. Los productos de saponificación se enfriaron a temperatura ambiente y se trasladaron a tubos de 25 X 200 mm con tapón de rosca. Posteriormente se añadieron 13.5 ml de HCl al 50 % v/v en agua (esta solución se empleó para arrastrar lo que hubiera quedado en la pared de los tubos de cultivo) y se agitaron suavemente por inversión. La primera extracción se realizó con 1 ml de CH₂Cl₂ grado HPLC, agitación vigorosa y separación la fase orgánica. El residuo acuoso se extrajo 2 veces más con 1 ml de CH₂Cl₂. Los extractos orgánicos se recolectaron en tubos de 13 X 100 mm con tapón de rosca y se llevaron a sequedad calentando a 60°C en un bloque de calentamiento y con corriente de N₂. Los residuos se analizaron como se describió previamente (2.4.1.2 y 2.4.1.3.).

2.6 Evaluación de resultados

Después de realizar el análisis cromatográfico y de contar las UFC/ml en las placas Petri previamente inoculadas, se determinaron la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los valores obtenidos en cada uno de los días en la determinación de ATAM por CLAR y en la determinación de UFC/ml en presencia y en ausencia de antifímico. Se realizó una correlación entre el ATAM y las UFC/ml y una correlación entre las cinéticas de crecimiento micobacteriano evaluadas por CLAR y por cuenta en placa. Además se compararon las cinéticas de crecimiento bacteriano en ausencia y en presencia de antifímico.

2.6.1 Correlación entre el ATAM y las UFC/ml

Para conocer la relación entre las UFC/ml y los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico, se realizó una gráfica de los valores de UFC/ml vs ATAM. Los valores experimentales se ajustaron a una ecuación exponencial empleando el método de regresión no lineal. Además, se realizó una gráfica de los valores del logaritmo de UFC/ml vs ATAM y los valores experimentales obtenidos se ajustaron a una ecuación lineal empleando el método de regresión lineal de mínimos cuadrados. Estos ajustes matemáticos se realizaron con ayuda del programa GraphPAD 2.0 que emplea el algoritmo iterativo de Marquardt (50).

2.6.2 Correlación de la cinéticas de crecimiento micobacteriano evaluadas por CLAR y por cuenta en placa

Se realizó una gráfica de los valores de ATAM vs tiempo y el logaritmo de UFC/ml vs tiempo. Estos datos experimentales se ajustaron a una ecuación sigmoideal empleando el método de regresión no lineal con ayuda del programa GraphPAD 2.0.

Se realizó una superposición de las gráficas obtenidas y se compararon cada una de las fases del crecimiento micobacteriano. En la fase lag se calculó el porcentaje de incremento del ATAM y del logaritmo de UFC/ml. Además, durante la fase exponencial se ajustaron los datos experimentales de cada una de las curvas cinéticas a respectivas rectas empleando el método de regresión lineal de mínimos cuadrados y se realizó una comparación cuantitativa de las pendientes. Por último, en la fase estacionaria se determinó el porcentaje de incremento del ATAM y del logaritmo de UFC/ml.

2.6.3 Comparación de las cinéticas de crecimiento micobacteriano en ausencia y presencia de antifímico

Se realizó una gráfica de los valores del ATAM y el logaritmo de UFC/ml vs tiempo en presencia de cada uno de los antifímicos. Estas gráficas se compararon con las curvas cinéticas correspondientes en ausencia de antifímico.

Para determinar el día a partir del cual se observó inhibición del crecimiento micobacteriano, se compararon los valores de ATAM y logaritmo de UFC/ml de cada día de las cinéticas en ausencia de antifímico con sus correspondientes de las cinéticas en presencia de antifímico mediante una prueba t de Student de muestras apareadas con $\alpha = 0.05$ con ayuda del programa Microsoft Excel 5.0.

2.7 Determinación de la sensibilidad por el método indirecto de proporción

Para determinar la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* por el método indirecto de proporción se siguió el método descrito por Kent (19).

2.7.1 Preparación de medios de cultivo

2.7.1.1 Preparación de solución concentrada de Isoniacida

Se pesaron 100 mg de Isoniacida de potencia 1000 mg/g (*Sigma, Chemical Company*) estéril, disolvieron en agua destilada estéril y se aforó a 100 ml. Se disolvió 1 ml de esta solución en agua destilada estéril y se aforó a 10 ml, para dar una solución de trabajo de concentración 100 $\mu\text{g/ml}$.

2.7.1.2 Preparación de solución concentrada de estreptomicina

Se pesaron 125 mg de sulfato de dihidroestreptomicina de potencia 800 mg/g (*Sigma Chemical Company*), se disolvieron en agua destilada estéril y se aforó a 10 ml. Se disolvió 1 ml de esta solución en agua destilada estéril y se aforó a 10 ml, para dar una solución de trabajo de concentración 1000 µg/ml.

2.7.1.3 Preparación del agar Middelbrook 7H10 con antifímico

El agar Middelbrook 7H10 se preparó de la manera que se describió anteriormente (2.5.1.4.) con las siguientes modificaciones:

Para el agar con Isoniacida, antes de vaciar a placas Petri se añadieron 0.4 ml de la solución concentrada de Isoniacida y se obtuvo una concentración final de 0.2 µg/ml.

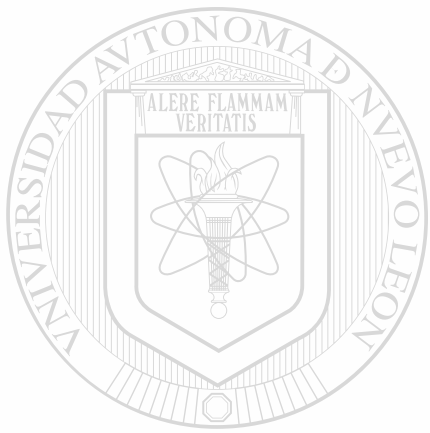
Para el agar con estreptomicina, antes de vaciar en placas petri se añadieron 0.4 ml de la solución concentrada de estreptomicina y se obtuvo una concentración final de 2.0 µg/ml.

2.7.2 Inoculación del medio de cultivo

Se transfirieron 0.1 ml de suspensión micobacteriana de trabajo a 9.9 ml de agua destilada estéril, esto generó una suspensión de dilución 1:100. Esta dilución se mezcló en un vortex por 5 min y se transfirieron 0.1 ml a 9.9 ml de agua destilada estéril, esto dio una dilución 1:10000.

Se inocularon 3 gotas de la dilución 1:100 de la suspensión micobacteriana de trabajo en un cuadrante con agar Middelbrook 7H10 e Isoniacida, 3 gotas en un cuadrante con agar Middelbrook 7H10 y estreptomicina y 3 gotas más en un cuadrante con agar Middelbrook 7H10 y sin antifímico. De la misma manera se inoculó la dilución 1:10000. Todo lo anterior se realizó por triplicado.

Se incubaron las placas a 35-37°C durante 4 semanas. Después de este tiempo se contaron las UFC/ml desarrolladas en el medio de cultivo control, así como en el medio de cultivo con antifímico.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Elementos de bioseguridad

Ya que se contó con el equipo, el material y la capacitación recomendada por el nivel de bioseguridad 2 y que se empleó de la manera adecuada, no se presentaron accidentes o contratiempos en el manejo del microorganismo.

3.2 Preparación del material biológico

Debido a que la cepa se congeló en viales, hubo un suministro constante de microorganismo. Además, el método empleado permitió conservar la cepa congelada y disponible para ser utilizada en estudios posteriores.

3.3 Estandarización del método de análisis de los ácidos micólicos

3.3.1 Análisis de los ácidos micólicos.

El proceso de extracción se llevó a cabo empleando siempre el mismo método y con tres extracciones consecutivas para extraer la cantidad máxima posible de ácidos micólicos. No se determinó el porcentaje de recuperación del proceso de extracción, pero sí se tomaron las precauciones necesarias para que no hubiera variaciones en este proceso y así lograr una buena reproducibilidad.

La reacción de derivatización se llevó a cabo en forma cuantitativa, ya que se empleó siempre una cantidad constante y en exceso de agente derivatizante (identificado

en los cromatogramas). Además, al aumentar la cantidad de microorganismos (determinada por el método de cuenta en placa), se incrementó la señal cromatográfica, indicando con ésto no haber sido un factor limitante.

Los ácidos micólicos no se cuantificaron, ya que no existen estándares comerciales disponibles para elaborar curvas de calibración de la señal cromatográfica. Sin embargo, ésto no representó problema para este trabajo, ya que se evaluó el ATAM a través del tiempo y este a su vez es un reflejo de los niveles de ácidos micólicos a través del tiempo.

Se obtuvieron cromatogramas característicos del análisis de ácidos micólicos como el que se muestra en la figura 11. Al inicio del cromatograma se aprecia un pico de tiempo de retención 0.3 min, cuya absorbancia excede la unidad. Este pico corresponde al exceso de agente derivatizante empleado al procesar la muestra ya que es más polar que los derivados de los ácidos micólicos analizados. Se asignaron números a los picos entre 7 y 10 min en base a su orden progresivo al emerger de la columna según el método descrito por Butler *et al* (36), como se muestra en la figura 11. Se calcularon las relaciones de altura de los picos 3 y 5, 4 y 7. La relación 3/5 es < 0.25 y la relación 4/7 es < 0.5 , por lo tanto el perfil cromatográfico se identificó como correspondiente a *Mycobacterium tuberculosis*.

3.3.2 Evaluación de la reproducibilidad del análisis de ácidos micólicos

La reproducibilidad del análisis de los ácidos micólicos, se evaluó mediante la determinación de la media, y el coeficiente de variación de los valores de ATAM obtenidos en el análisis de una muestra por cuadruplicado. Se obtuvo una media de 7.2 y un coeficiente de variación del 14 %, el cual se considera aceptable para muestras biológicas. Además, los ensayos cinéticos evaluados por CLAR se hicieron por

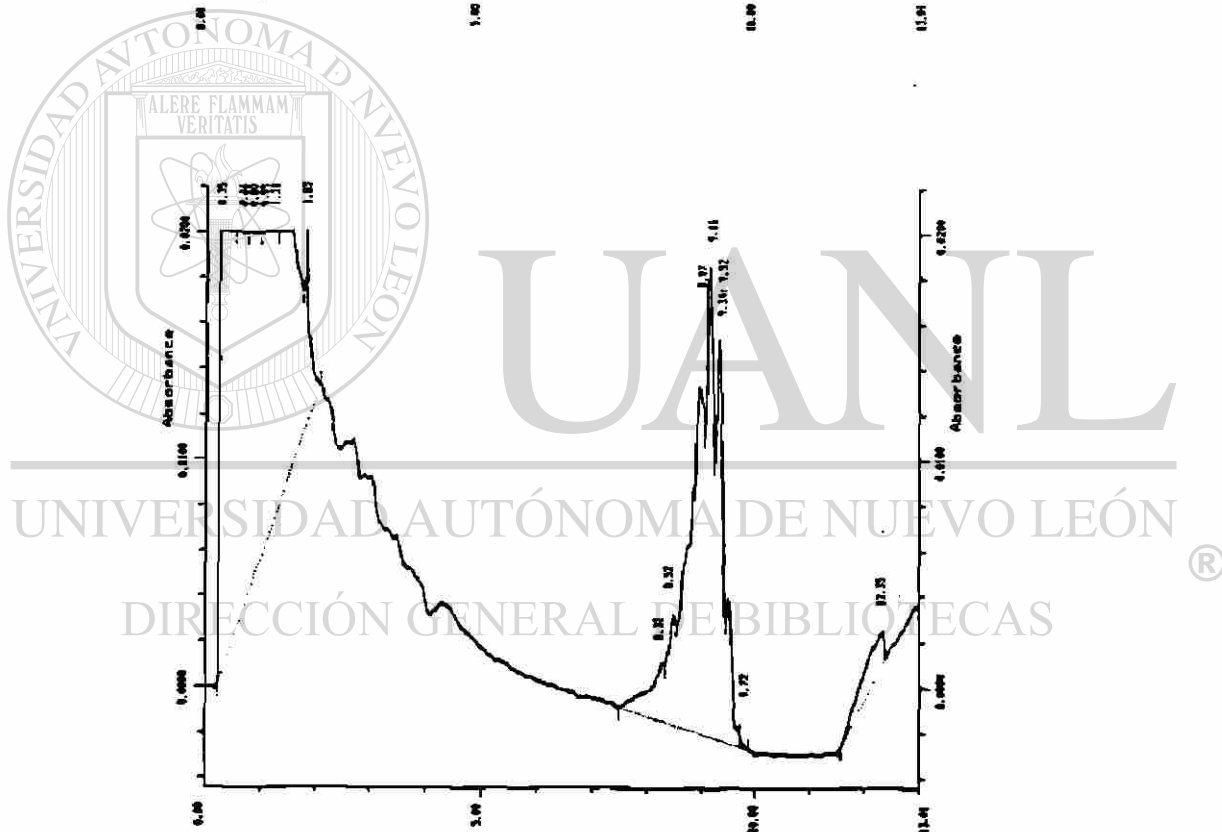


Figura 11. La figura superior muestra un cromatograma característico del análisis de los ácidos micóticos. La figura inferior muestra una ampliación de los picos entre 7 y 10 min y que corresponden a los ácidos micóticos. Los números se asignaron en base al orden progresivo al emerger de la columna según el método descrito por Butler *et al* (36).

triplicado y se obtuvieron coeficientes de variación de los valores de ATAM menores del 17% a partir del tercer día.

3.4 Cinética de crecimiento en ausencia de antifímico por cuenta en placa y por CLAR

Una vez que se estandarizó y se aceptó el método de análisis, se inició el estudio cinético en ausencia de antifímico.

En la figura 12 se presenta la relación de UFC/ml y el ATAM correspondientes a cada uno de los días analizados. Los datos obtenidos se ajustaron a una curva exponencial ($r^2 = 0.95$). Esta relación se ratificó con la relación lineal ($r^2 = 0.98$) obtenida en la gráfica semilogarítmica de UFC/ml vs ATAM (figura 13), e indica que el logaritmo de UFC/ml es directamente proporcional al ATAM y por lo tanto es posible calcular las UFC/ml de una suspensión micobacteriana problema con el ATAM determinado por CLAR. Esto representa una disminución en el tiempo necesario para analizar una muestra, ya que en el método de cuenta en placa se requiere un mínimo de 3 semanas y para la determinación de ATAM por CLAR se requiere de un mínimo de 2 horas.

La figura 14 presenta la superposición de las gráficas del logaritmo de UFC/ml vs tiempo y el ATAM vs tiempo, los resultados experimentales se ajustaron a ecuaciones sigmoidales ($r^2 = 0.97$ y 1.00 , respectivamente). Considerando el logaritmo de UFC/ml vs tiempo, se ubicaron las fases lag, exponencial y estacionaria del crecimiento micobacteriano.

En la fracción de la curva entre el día 0 al día 6 se observa un ligero incremento entre el logaritmo de UFC/ml (10.2 %) y corresponde a la fase lag de la cinética de crecimiento. En esta fase los microorganismos se adaptan al medio ambiente (2). En la

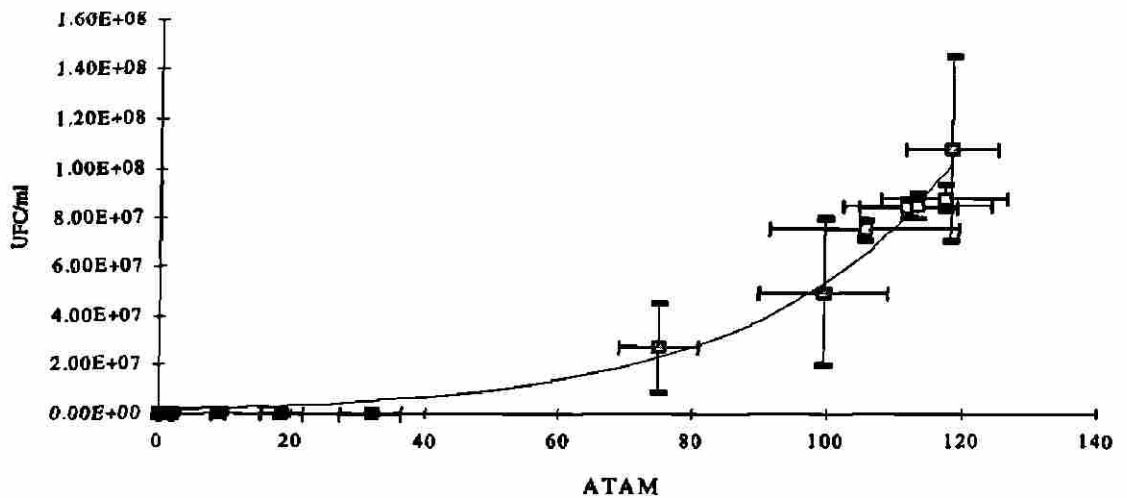


Figura 12.

UFC/ml vs ATAM. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar de la media ($n = 3$) y la curva el ajuste matemático a la ecuación exponencial

$$UFC/ml = 1.6 \cdot 10^6 e^{0.35 ATAM} \quad (r^2 = 0.95)$$

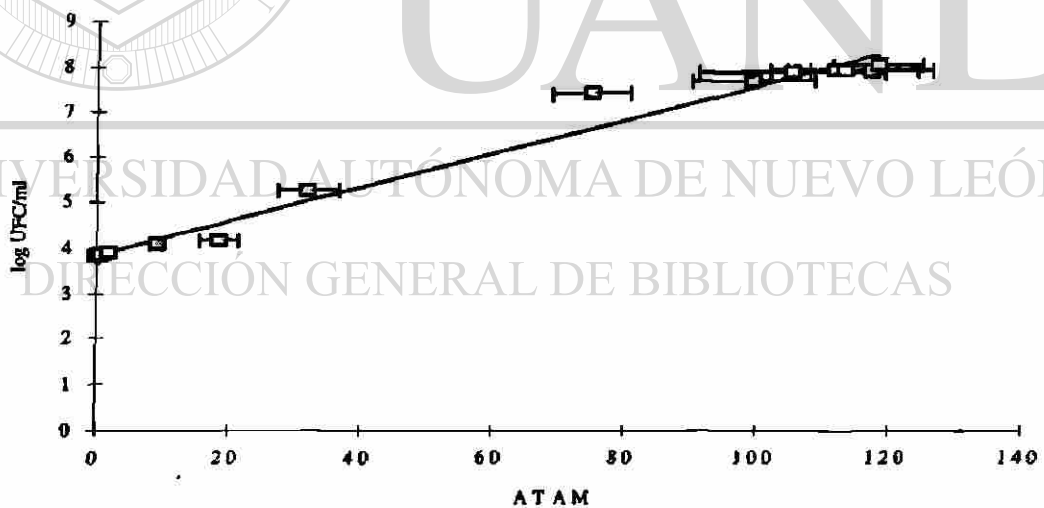


Figura 13

Log UFC/ml vs ATAM. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar de la media ($n = 3$) y la curva el ajuste matemático a la ecuación de la recta.

$$\log UFC/ml = 3.7 \cdot 10^{-2} ATAM + 3.8 \quad (r^2 = 0.98)$$

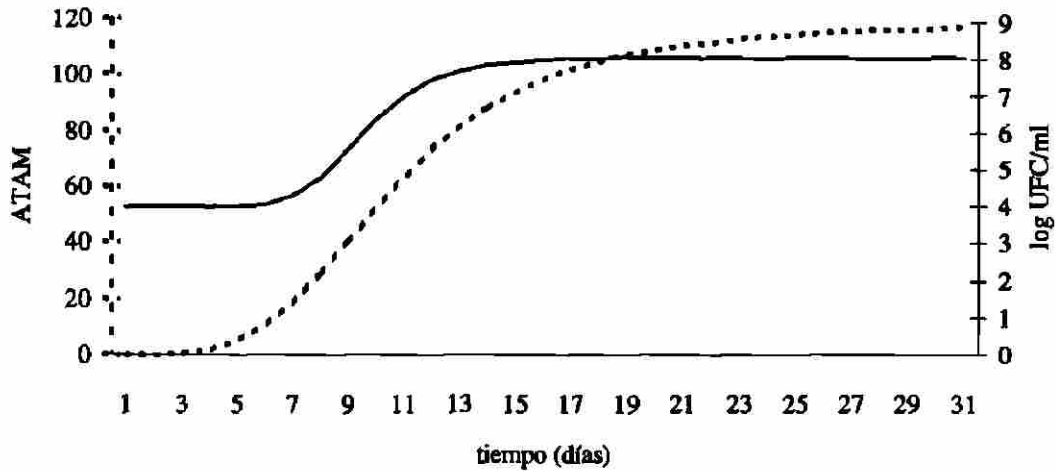


Figura 14.

Log UFC/ml vs tiempo y ATAM vs tiempo. El eje punteado corresponde a la gráfica punteada. Las curvas representan los ajustes matemáticos a las ecuaciones

$$\text{Log UFC / ml} = \frac{4.1 \cdot t^{6.8}}{t^{6.8} + 2.3 \cdot 10^6} \quad (r^2 = 0.97)$$

$$\text{ATAM} = \frac{124.9 \cdot t^2}{t^2 + 1000} \quad (r^2 = 1.00)$$

curva de ATAM vs tiempo se observa un mayor incremento del ATAM (20,800 %) que el incremento observado en la curva de logaritmo de UFC/ml. Estos resultados indican que aunque la reproducción celular es mínima, hay producción de ácidos micólicos.

Del día 6 al día 13 se aprecia en ambas gráficas una relación lineal con pendientes similares (0.09 y 0.11, respectivamente) y corresponde a la fase exponencial. Estos resultados indican que los incrementos por unidad de tiempo en el logaritmo de UFC/ml y en ATAM son constantes y similares, por lo tanto, si se analizan como reacciones de primer orden, las constantes de velocidad son similares. En esta fase hay un aumento exponencial en el número de células, éstas son más pequeñas y se alcanza una etapa estable del metabolismo (1-6).

A partir del día 13 se aprecia un aumento discreto en el ATAM (18.9 %) a pesar de que las UFC/ml permanecen constantes y corresponde a la fase estacionaria. En esta fase hay un aumento muy pequeño en la cantidad de células, ésto se ve determinado, fundamentalmente por la variación de pH del medio, agotamiento de nutrientes y acumulación de productos de desecho (1-6).

3.5 Cinética de crecimiento en presencia de antifímico por cuenta en placa y por CLAR

Con el fin de determinar si era posible detectar la inhibición del crecimiento micobacteriano determinando el ATAM por CLAR, se realizó la cinética de crecimiento en las mismas condiciones que la cinética anterior pero en presencia de antifímico. Además, la misma se llevó a cabo mediante la determinación de las UFC/ml.

La gráfica izquierda de la figura 15 presenta la variación del logaritmo de UFC/ml vs tiempo y ATAM vs tiempo en presencia de isoniacida. Del día 0 al 4 se aprecia una disminución en el logaritmo de UFC/ml y permanece constante a partir del cuarto día.

Del día 0 al 3 se aprecia aumento en el ATAM, a partir del tercer día no hay variación. Se realizó una prueba t de student asumiendo igualdad de varianzas para comparar las medias de los resultados obtenidos en presencia y ausencia de isoniacida para cada día y se obtuvieron diferencias significativas con $p < 0.01$ a partir del tercer día. Este resultado indica que a partir del tercer día las cinéticas de crecimiento son diferentes.

La gráfica derecha de la figura 15 muestra la variación del logaritmo de UFC/ml vs tiempo y ATAM vs tiempo en presencia de estreptomycin. Del día 0 al 5 hay una disminución en el logaritmo de UFC/ml y no hay variación a partir del quinto día. El ATAM se incrementa del día 0 al 3 y a partir del tercer día permanece constante.

Se realizó una prueba t de student asumiendo igualdad de varianzas para comparar las medias de los resultados obtenidos en presencia y ausencia de estreptomycin para

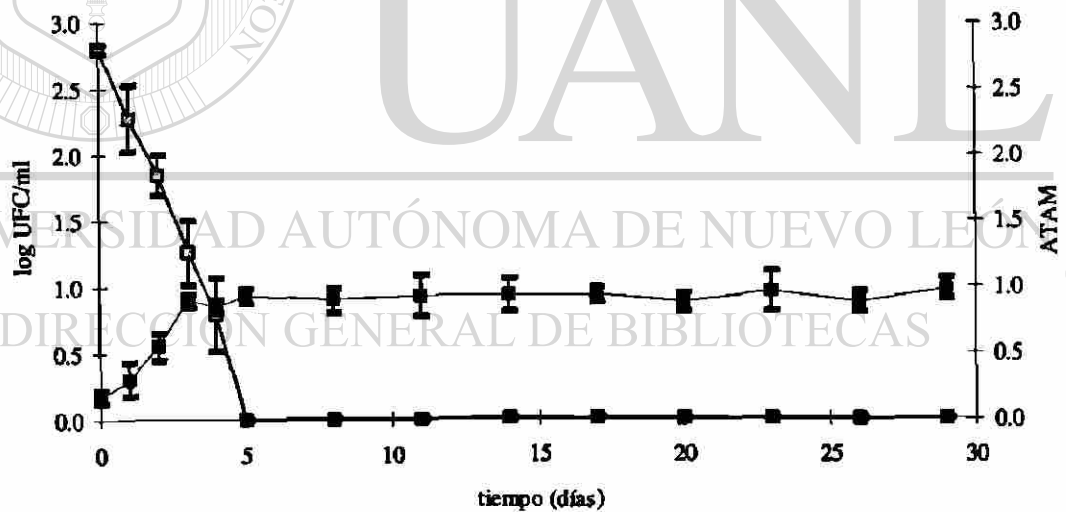
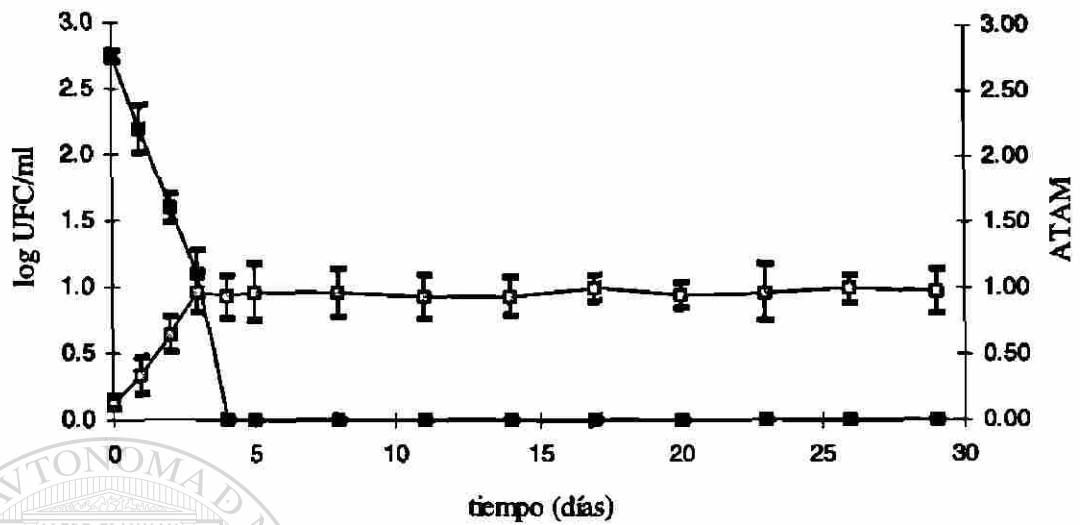


Figura 15

La gráfica superior presenta la variación del logaritmo de UFC/ml vs tiempo y de ATAM vs tiempo en presencia de isoniacida. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar de la media (n = 3). La gráfica inferior presenta la variación del logaritmo de UFC/ml vs tiempo y de ATAM vs tiempo en presencia de estreptomicina. Los puntos representan la media \pm la desviación estándar de la media (n = 3).

cada día y se obtuvieron diferencias significativas con $p < 0.01$ a partir del cuarto día. Este resultado indica que a partir del cuarto día las cinéticas de crecimiento son diferentes.

Los resultados obtenidos indican que es posible detectar la inhibición del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en presencia de isoniacida o estreptomina por CLAR en tres y cuatro días respectivamente, mientras que en la técnica tradicional se requiere de al menos tres semanas para obtener los resultados de sensibilidad. Sin embargo, son necesarios estudios posteriores para la estandarización del método como prueba de sensibilidad, ya sea a partir del microorganismo o de la muestra.

3.6 Determinación de la sensibilidad por el método indirecto de proporción

En las pruebas de sensibilidad por el método indirecto de proporción, los cuadrantes de cada uno de los antimicrobianos no mostraron desarrollo, los cuadrantes control mostraron un crecimiento de 50 a 100 colonias, considerando la prueba válida (17-22). La cepa empleada es sensible a isoniacida y estreptomina, tal como está reportado.

Ya que la CLAR se emplea actualmente en pruebas de identificación y diferenciación del género *Mycobacterium*, la estandarización del empleo por CLAR en pruebas de sensibilidad permitirá realizar simultáneamente ambos estudios empleando la misma técnica.

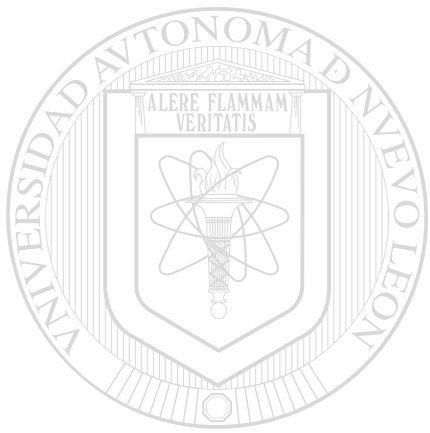
CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron cromatogramas característicos del análisis de ácidos micólicos. Se identificaron los picos correspondientes a ácidos micólicos de *Mycobacterium tuberculosis* de acuerdo al perfil cromatográfico y los tiempos de retención reportados en la literatura.
- Se empleó el área total correspondiente a los picos de ácidos micólicos (ATAM) como parámetro de estimación de los niveles de ácidos micólicos.
 - En la estandarización del análisis cromatográfico, los valores de ATAM mostraron un coeficiente de variación menor del 14 %, lo cual indica una buena reproducibilidad del análisis cuantitativo de ATAM.
 - En las muestras analizadas para estudios cinéticos se obtuvieron valores de ATAM con coeficientes de variación menores del 17 % a partir del cuarto día, mostrando así una buena reproducibilidad en los estudios cinéticos.
- Con la cinética de crecimiento en ausencia de antifímico evaluada por el método de cuenta en placa, se ubicaron la fase lag del día 0 al día 6, la fase exponencial del día 6 al 13, y la fase estacionaria a partir del día 13.
- Al correlacionar las cinéticas de crecimiento obtenidas por el método de cuenta en placa y por CLAR se aprecia que, en la fase lag, el valor de ATAM permite detectar el metabolismo microbiano 3 días antes que determinando el logaritmo de UFC/ml y en la fase exponencial el incremento por unidad de tiempo del logaritmo de UFC/ml y del ATAM son constantes y similares.
- Las UFC/ml guardan una relación exponencial con los valores de ATAM. Ésto indica que el logaritmo de UFC/ml es directamente proporcional al ATAM.

- Las cinéticas de crecimiento en presencia de antifímico determinadas por cuenta en placa mostraron una disminución del logaritmo de UFC/ml los primeros 4 días para isoniácida y 5 para estreptomícina, lo cual indica una inhibición del crecimiento micobacteriano. No se observan microorganismos viables en el medio de cultivo a partir de cada uno de los días.
- Las cinéticas de crecimiento determinadas por CLAR en presencia de antifímico, mostraron que el ATAM aumenta hasta el día 3 para isoniácida y 4 para estreptomícina y permanece prácticamente constante a partir de estos días.
- Al correlacionar las cinéticas de crecimiento obtenidas en presencia de antifímico por los métodos de cuenta en placa y por CLAR, se aprecia que los valores de ATAM obtenidos a partir del día 4 para isoniácida y 5 para estreptomícina corresponden a células no viables.
- En la correlación de las cinéticas de crecimiento obtenidas en presencia y en ausencia de antifímico por los métodos de cuenta en placa y por CLAR, se concluye que la determinación de ATAM por CLAR permite determinar en un tiempo mínimo de 4 días si la cepa estudiada es capaz de desarrollarse en presencia de estreptomícina o isoniácida.
- En la determinación de la sensibilidad por el método indirecto de proporción [®] presentó desarrollo de microorganismos en los cuadrantes con antifímico y presentó desarrollo aceptable en el cuadrante control, por lo tanto la cepa empleada es sensible a los antifímicos probados.
- Los resultados de las pruebas de sensibilidad por el método indirecto de proporción se obtuvieron en 3 semanas, mientras que en la determinación de la sensibilidad por CLAR se obtuvieron resultados en un tiempo mínimo de 4 días.
- De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que es posible emplear la técnica CLAR para la determinación de la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a isoniácida y estreptomícina en un tiempo mínimo de 4 días, el cual es

un tiempo mucho menor que las 3 semanas necesarias para obtener resultados si se emplea el método indirecto de proporción.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Elvira Garza González

Fecha de Graduación: Enero de 1996

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

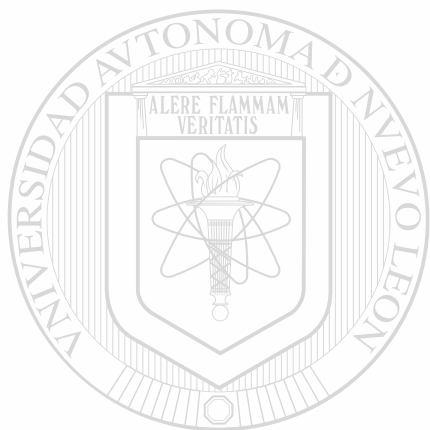
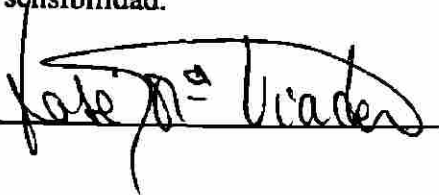
Título del Estudio: SENSIBILIDAD DE *Mycobacterium tuberculosis* A ESTREPTOMICINA E ISONIACIDA DETERMINADA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN Y POR DILUCIÓN Y SIEMBRA EN PLACA

Número de páginas: 56 **Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Química Analítica**

Propósito y método del estudio: La tuberculosis es una enfermedad infecciosa producida por *Mycobacterium tuberculosis*. La pandemia de SIDA y la evidencia de su relación con tuberculosis ha generado un marcado incremento en la incidencia de esta enfermedad en algunos países cambiando radicalmente su epidemiología. Además, hay un marcado incremento de cepas multiresistentes a los antifímicos, por ello se considera de gran importancia el desarrollo de métodos que permitan conocer en el menor tiempo posible la sensibilidad de las diferentes cepas. En el presente trabajo se desarrolló un método para determinar la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a isoniacida y estreptomicina analizando ácidos micólicos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). Se empleó la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177. Se preparó la cepa para tener un suministro constante de microorganismos en la misma fase del desarrollo micobacteriano. Para el análisis cromatográfico se empleó un Cromatógrafo de Líquidos System Gold, una columna analítica de fase reversa, un detector UV-VIS de arreglo de diodos y un sistema de elución en gradiente. Se estandarizó el método de análisis de los ácidos micólicos, con el fin de identificar los picos correspondientes a los ácidos micólicos y obtener una buena reproducibilidad en el área total de dichos picos cromatográficos. Se realizaron las cinéticas de crecimiento micobacteriano en presencia y en ausencia de antifímico evaluando el área total correspondiente a los picos de ácidos micólicos (ATAM) a través del tiempo. Para validar los resultados obtenidos se compararon dichas cinéticas con sus correspondientes pero evaluadas por cuenta en placa como UFC/ml. Para determinar el día a partir del cual se observó inhibición del crecimiento micobacteriano, se compararon los valores de ATAM y el logaritmo de UFC/ml de cada una de las cinéticas en ausencia de antifímico con sus correspondientes de las cinéticas en presencia de antifímico mediante una prueba t de student con $\alpha = 0.05$ con ayuda del programa Microsoft Excel 5.0.

Contribuciones y Conclusiones: Se obtuvieron cromatogramas característicos del análisis de ácidos micólicos y se encontró una relación lineal entre el logaritmo de UFC/ml vs ATAM ($r^2 = 0.98$). Los resultados obtenidos indican que es posible detectar la inhibición del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en presencia de isoniacida o estreptomina por CLAR en tres y cuatro días respectivamente, mientras que el método tradicional de proporción requiere 3 semanas para obtener los resultados de sensibilidad.

Firma del asesor: _____



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Grange, J. M. Enfermedades Micobacterianas. Editorial PLM, México (1980).
 - 2 Joklik, Willett. Zinsser, Microbiología. 18a ed. Ed. Panamericana. Argentina (1984).
 - 3 Lenette, E.H., Balows. Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. Edited by the American Society for Microbiology (1985).
 - 4 Bloom, B.R. Tuberculosis. Pathogenesis, protection and control. ASM Press, USA (1994).
 - 5 Youmans, G. P. Tuberculosis. WB Saunders Company, USA (1979).
 - 6 Koneman, E.W. Diagnóstico Microbiológico. Ed Panamericana (1985).
-
- 7 Hopewell, P.C., Mills, J. Mycobacterioses and the Acquired Immunodeficiency Syndrome. Am.Rev.Respir.Dis. 136: 492-496 (1986).
 - 8 Selwyn, P.A. A perspective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. N.Engl.J.Med. 320:545-550 (1989).
 - 9 Stead, W.W. Racial differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. N.Engl.J.Med 322:422-427 (1990).
 - 10 Barnes, P.F., Bloch, A.B. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. N.Engl.J.Med. 324:1644-1649 (1991).

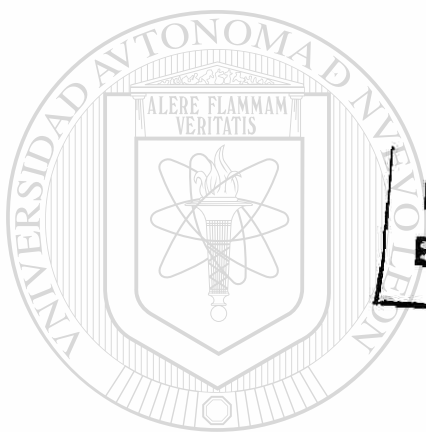
- 11 Ortega, H.H., De Cosío. Boletín Epidemiológico Fronterizo, Actividades Llevadas a Cabo para el Control y Epidemiología de la Tuberculosis en el Condado de San Diego, California Año XVIII No2 (1991).
- 12 Hershfield, E. Tuberculosis in children, Guidelines for diagnosis, prevention and treatment. U.Tuberc.Lung.Dis. 66:114-119 (1991).
- 13 Daley, Ch. L. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. N.Engl.J.Med. 326:231-235 (1992).
- 14 Hopewell, P.C. Impact of Human Immunodeficiency Virus Infection on the Epidemiology Clinical Features, Management and Control of Tuberculosis. Clin.Infect.Dis. 15:540-547. 1992).
- 15 Bass, J., Farer, L. Control of Tuberculosis in the United States. Am.Rev,Respir.Dis. 146:1623-1633 (1993).
- 16 Del Villar. La Tuberculosis en la Década de 1990. Infect. Año 12, No.6 (1992).
- 17 García, R. Manual Para Aislamiento e Identificación de *M.Tuberculosis* y otras micobacterias. 2a ed. Editado por el IPN (1984).
- 18 Manual de Técnicas y Procedimientos de Laboratorio en Tuberculosis. Secretaría de Salud. México (1985).
- 19 Kent, P.T., Kubica, G.P. Public Health Mycobacteriology. A Guide For The level III Laboratory. U.S. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control, Atlanta (1985).
- 20 Finegold, S.M., Baron E.J. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 7th ed. The C.V. Mosby Company (1986).
- 21 Sonnenwirth, A.C., Jarett, L. Métodos Diagnósticos del Laboratorio Clínico, tomo 2, 8a ed. Editorial Panamericana (1986).

- 22 Kubica, G. P. Isolation and Identification of *Mycobacterium tuberculosis*. A guide for the level II laboratory. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta Georgia.
- 23 Desmond, E.P. Molecular Approaches to the identification of Mycobacteria. *Clinical Microbiol. New.* 14:145-149 (1992).
- 24 Hermans, P.W., Schitema, A.R. Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains by Polymerase Chain Reaction *J.Clin.Microbiol.* 28:1204-1213 (1990).
- 25 Yoon, K.H., Ch. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples from patients with tuberculosis or other pulmonary diseases by polymerase chain reaction. *Yonsei.Med.J.* 33:209-216 (1992).
- 26 Nolte, S., Metchock, B. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *J.Clin.Microbiol.* 31:1777-1782 (1993).
- 27 Forbes, B.B., Hicks, K. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. *J.Clin.Microbiol.* 31:1688-1694 (1993).
-
- 28 Barrera, H.A., Ortiz, R., Rojas, A. Reacción en cadena de la polimerasa. Una nueva época dorada en la biología molecular. *Ciencia y desarrollo* Feb. 50-60 (1993).
- 29 Tisdal, P.A. Glenn, D.R., Anhalt, J.P. Identification of Clinical Isolates of Clinical Isolates of mycobacteria with Gas-Liquid Chromatography Alone. *J.Clin.Microbiol.* 16:400-402 (1979).
- 30 Tisdall, P.A., De Young, D.R., Glen, D.R. Identification of clinical Isolates of Mycobacteria with gas-Liquid Cromatography: a 10 Month Folow Up Study. *J.Clin.Micorbiol.* 16:400-402 (1982).

- 31 Silcox, V.A. Identification of clinically significant *Mycobacterium fortuitum* complex isolates. *J.Clin.Microbiol.* 14:686-691 (1981).
- 32 Knisley, C.V., Darnato, J. Rapid and sensitive Identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* 22:761-767 (1985).
- 33 Butler, W.R., Ahearn, D.G. 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 (1986).
- 34 Butler, W.R., Kilburn, J.O. Identification of Major Growing Pathogenic Mycobacteria and *Mycobacterium gordonae* by High-Performance Liquid Chromatography of Their Mycolic Acids. *J.Clin.Microbiol.* 26:50-53 (1988).
- 35 Butler, W.R., Kilburn, J. O. High Performance Liquid Chromatography Patterns of Mycolic Acids as a criteria for Identification of *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, and *Mycobacterium smegmatis* . *J.Clin.Microbiol.* 28:2094-2098 (1990).
- 36 Butler, W.R., Jost, K. Identification of Mycobacteria by High-Performance Liquid Chromatography. *J.Clin.Microbiol.* 29:2468-2472 (1991).
-
- 37 Butler, W.R., Thiberth, L. Identification of *Mycobacterium avium* Complex Strains and Some Similar Species by High-Performance Liquid Chromatography. *J.Clin.Microbiol* 30:2698-2704 (1992).
- 38 Floyd, M. M., Silcox, V.A. Separation of *Mycobacterium bovis* BCG from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by Using High-Performance Liquid Chromatography of Mycolic Acids. *J.Clin.Microbiol.* 30:1327-1330 (1992).
- 39 Thiberth, L., Lapiere, S. Routine Application of High-Performance Liquid Chromatography for Identification of Mycobacteria. *J.Clin.Microbiol.* 31:1759-1763 (1993).

- 40 Guthertz, L.S., Lim, S. D. Curvilinear-Gradient High-Performance Liquid Chromatography for identification of Mycobacteria. *J.Clin.Microbiol.* 31:1876-1881 (1993).
- 41 Snider, D. E. Good.Rapid Drug-Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am.Rev.Respir.Dis.* 123:402-406 (1980).
- 42 Davidson, P.T. Treating Tuberculosis: What Drugs, for How long?. *An.Int.Med.* 112:393-395 (1990).
- 43 Bass, J.B. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 142:725-735 (1990).
- 44 Small, P.M. Treatment of tuberculosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N.Engl.J.Med.* 324:289-294 (1991).
- 45 Cooksey, R.C., Crawford, J.T. A Rapid Method for Screening Antimicrobial Agents for Activities against a Strain of *Mycobacterium tuberculosis* Expressing Firefly Luciferase. *Antimicrob.Ag. and Chem.* 37:1348-1352 (1993).
- 46 Coronado,V.G., Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with human immunodeficiency virus infection in an urban hospital: epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. *J.Infect.Dis.* 168:4 (1993).
- 47 Lordi, G.M., Reichman, L.B. Tuberculosis resistente a medicamentos: la nueva cara de un viejo enemigo *Infect.* Año 14. Núm 9 431-438 (1994).
- 48 Grushka, E. Liquid chromatography separation and detection of nanogram quantities of biologically important dicarboxylic acids. *J.Chrom.* 112:673-678 (1975).
- 49 Boch, R.F. Separation of Long Chain Fatty Acids as Phenacyl Esteres by High Pressure Liquid Chromatography. *Anal.Chem* 47:2437-2439 (1975).

- 50 Rebadiana, S. Use of p-bromophenacyl bromide to enhance ultraviolet detection of water-soluble organic acids (Steviolbioside and Rebaydioside B) in high-performance liquid chromatography analysis. *J.Chrom.* 192:387-393 (1980).
- 51 Marquardt, D.W. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *J.Soc.Ind.Appl.Math.* 11:431-441 (1963).
- 51 Pardell, H., Cobo. Manual de bioestadística. 1a ed. Ed. De Masson, S.A., España (1986).



BIBLIOTECA, DIVISION
ESTUDIOS SUPERIORES

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

