

UTILIDAD DE LA CROMATOGRAFIA GASEOSA PARA LA IDENTIFICACION DE MICOBACTERIAS

ELSA ZERBINI^{1,2}, MARIA M. CARDOSO¹, MARIA D. SEQUEIRA², MARIA N. SANTI¹, HUGO TAHER¹, DANIEL LARPIN¹, OMAR LATINI², GEORGINA TONARELLI¹

¹ Departamento de Química Orgánica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe; ² Departamento de Diagnóstico y Referencia, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Emilio Coni, ANLIS Carlos Malbrán, Santa Fe

Resumen El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) causa un profundo impacto sobre el problema de la tuberculosis (TBC) tanto en los países industrializados como en los en vía de desarrollo. Enfermedades graves causadas por micobacterias no tuberculosas, la mayoría correspondientes al Complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC), se han vuelto muy comunes en asociación con la inmunosupresión severa. El aumento de complejidad en las enfermedades micobacterianas ha estimulado el desarrollo de métodos diagnósticos más rápidos y eficientes. El presente trabajo pretende investigar la especificidad y aplicabilidad de la técnica de cromatografía gaseosa (CG) para el diagnóstico de micobacterias de importancia clínica en Argentina. Se tipificaron mediante CG 183 aislamientos clínicos de micobacterias, empleando como *gold standard* las pruebas bioquímicas clásicas. Del total de aislamientos analizados, 69% fueron correctamente identificados a nivel de especie y 5% incorrectamente. Si sólo se tienen en cuenta los aislamientos que pudieron ser clasificados, 93% lo fueron correctamente. Entre las especies de mayor interés clínico en Argentina, fueron correctamente identificados todos (40/40) los aislamientos clasificables de *M. tuberculosis*, 15/16 aislamientos de *M. bovis* y 39/43 aislamientos de MAC. La CG representa una técnica rápida y de alto valor predictivo para la identificación de micobacterias en las condiciones de Argentina. Su aplicación en laboratorios de referencia es recomendable en este país u otros de Latinoamérica con una situación epidemiológica de la TBC similar y disponibilidad de esta tecnología.

Abstract *Utility of gas chromatography for the identification of mycobacterial species.* The human immunodeficiency virus (HIV) epidemic has altered the epidemiological profile of tuberculosis in both industrialized and developing countries. Serious diseases caused by mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*, mostly belonging to the *M. avium-intracellulare* complex (MAC), have become very common in association with severe immunosuppression. The increase in mycobacterial disease complexity has stimulated the development of more rapid and efficient methods for diagnosis. In the present study, we investigated and assessed the suitability of a gas-liquid chromatography technique for diagnosis of clinically important *mycobacteria* in Argentina. An identification scheme was developed from the results obtained in a previous study where we characterized the cellular fatty acids and the mycolic acid cleavage products from most frequent species in Argentina. Of 183 isolates tested, 69% were correctly identified to species level and 5% were incorrectly classified. If we only take into account the isolates that could be identified, 93% were correctly identified. Although all of the isolates of *M. tuberculosis* were correctly identified, four isolates of MAC were incorrectly matched by *M. tuberculosis*. Gas chromatography provides a rapid technique of highly predictive value for mycobacteria identification; it could be used in reference laboratories as a rapid presumptive identification until the biochemical tests are completed.

Key words: tuberculosis, mycobacteria, gas chromatography

La tuberculosis (TBC) continúa siendo uno de los principales problemas de salud en muchas partes del mundo. La Organización Mundial de la Salud estima que cada año ocurren más de ocho millones de casos de TBC, produciéndose tres millones de muertes¹.

El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) tiene un profundo impacto sobre el problema de la TBC. Las

enfermedades graves causadas por micobacterias no tuberculosas (MNT), la mayoría correspondiente al Complejo *Mycobacterium avium* (MAC), se han vuelto más frecuentes en asociación con la inmunosupresión severa^{2,4}. En el caso de pacientes con SIDA, es necesario conocer a la brevedad la especie causante de la enfermedad a fin de instituir una terapia adecuada, ya que la evolución en estos pacientes es muy rápida. El tratamiento estándar de TBC da buenos resultados en casos de enfermedad causada por *M. tuberculosis* y por *M. bovis*, a pesar de la resistencia de este último a la pirazinamida; pero, en casos de MAC u otras especies, el esquema de tratamiento de elección en el huésped

Recibido: 18-VI-1999

Aceptado: 23-VIII-1999

Dirección postal: Dra. Elsa Zerbiní, Departamento de Diagnóstico y Referencia, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Emilio Coni, Blas Parera 8260, 3000 Santa Fe, Argentina
Fax: (54) 0342-4892827 E-mail: ezerbini@fbc.unl.edu.ar

inmunosuprimido es diferente y se basa en el uso de por lo menos tres drogas: un macrólido, etambutol y otro agente antimicrobiano⁴.

En 1997 en Argentina, la tasa de morbilidad por TBC obtenida de las notificaciones fue de 35.5 por 100 000 habitantes. En el grupo de 25 a 29 años, donde la proporción de coinfectados con el HIV entre los casos de TBC alcanza al 12%, se observó un aumento de las tasas de morbilidad de casi el 7% con respecto a 1996. En 1995, el 15.7% del total de defunciones por TBC tenían relación con SIDA, aumentando al 21.6% en 1996⁵.

La frecuencia de enfermedades debidas a MNT con respecto a las producidas por el *M. tuberculosis*, ha sido baja en Argentina. Entre 1982 y 1984 la incidencia media en seis regiones del país fue 0.36%. En la mayoría de los casos esa enfermedad se debió a cepas del MAC⁶. 7. Datos registrados en el período 1993-94 en el Hospital Cetrángolo de Vicente López (Buenos Aires) en los pacientes coinfectados con el HIV, indican un incremento de infecciones causadas por MNT, representando el MAC el 5.7% del total de micobacterias aisladas, cinco veces más que en los pacientes sin factores de riesgo aparente para HIV⁸. Di Lonardo y col. encontraron un 6.2% de MNT en pacientes con serología positiva para HIV en el Hospital Muñiz de Buenos Aires, correspondiendo al MAC el 5.8%⁹. Por otro lado, Pérez y col. hallaron un 26% de MNT en 1515 casos de SIDA en el Hospital Fernández de la misma ciudad, representando el MAC el 8.8%¹⁰.

Los métodos convencionales de identificación de micobacterias mediante criterios morfológicos y características bioquímicas, requieren al menos cuatro semanas y algunas técnicas necesitan un desarrollo de más de 50 colonias para su realización¹¹.

Los ensayos con sondas moleculares que pueden ser completados en pocas horas y son sensibles, ofrecen una aproximación a la identificación rápida de micobacterias. Sin embargo, no hay sondas disponibles para todas las especies micobacterianas y las que se emplean para reconocer el MAC no identifican a todas las cepas¹². Además, los costos en los países no industrializados son grandes debido a la necesidad de importar los reactivos.

El análisis de la composición lipídica por varios procedimientos cromatográficos es también reconocido como una herramienta útil para diferenciar especies micobacterianas. Algunos autores han señalado el valor del estudio de los ácidos micólicos por cromatografía en capa delgada como primer paso en la identificación de micobacterias en los laboratorios clínicos^{13, 14}. La cromatografía líquida de alta *performance* (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) en fase reversa de los ésteres de ácidos micólicos, ha demostrado ser un método rápido, reproducible y específico para la identificación de especies micobacterianas, resultando con

una especificidad y sensibilidad del 99.7 y 100.0% respectivamente para el Complejo *M. tuberculosis* (MTC) y del 95.7 y 100% para el MAC¹⁵. Otra línea en desarrollo en el campo de las técnicas rápidas es el análisis de los ácidos grasos (AG) de la pared celular por medio de la cromatografía gaseosa (CG), método que se basa en la composición altamente específica de las paredes celulares micobacterianas¹⁶. Los resultados obtenidos con CG son muy variados; Yassin encontró una gran homogeneidad dentro del género *Mycobacterium* y los perfiles de AG obtenidos no fueron muy útiles en distinguir entre los miembros del género excepto para la identificación de *M. gordonae*, *M. kansasii* y *M. gastri*¹⁷. Maliwan demostró que podía distinguir *M. tuberculosis* de MNT con un buen grado de exactitud empleando un modelo de identificación computarizado acoplado al cromatógrafo gaseoso¹⁸. Smid y Salfinger empleando CG combinada con un *software* para identificación microbiana, clasificaron correctamente el 63% de 1 077 aislamientos e incorrectamente el 6%; el 31% restante resultó no clasificable¹⁶.

En uno de los laboratorios de referencia en TBC de Argentina no se disponía de luminómetro para el empleo de sondas moleculares, pero sí se tenía acceso a un cromatógrafo gaseoso por lo que, considerando la diversidad de resultados obtenidos con CG y la falta de estandarización, se decidió desarrollar y estandarizar una técnica rápida de tipificación por CG aplicable a los aislamientos en medio Lowenstein Jensen, que es el medio recomendado para América Latina por la Comisión Latinoamericana de Bacteriología de la TBC. Para ello, en un estudio previo a éste se caracterizó la composición de AG y productos de degradación de ácidos micólicos (PDAM) en las especies micobacterianas de mayor incidencia en Argentina, empleando CG y espectrometría de masa (EM)¹⁹. En ese estudio no se observaron diferencias cualitativas sino cuantitativas en el perfil de AG y PDAM de las diferentes especies micobacterianas analizadas. Los principales AG detectados en la mayoría de las especies estudiadas fueron los ácidos octadecenoico (C18:1) y hexadecanoico (C16:0); el ácido tuberculoesteárico se detectó en todas las especies analizadas.

El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la especificidad y aplicabilidad del método estandarizado en la Argentina, un país de desarrollo intermedio y con prevalencia mediana de TBC.

Materiales y métodos

Cultivos bacterianos. Se estudiaron 183 aislamientos micobacterianos recientes en medio Lowenstein Jensen y Stonebrink, los que fueron analizados al mismo tiempo mediante la técnica de CG y las pruebas bioquímicas clásicas, siendo estas últimas empleadas como *gold standard*²⁰. Dichos aisla-

TABLA 1.- Parámetros evaluados para la clasificación de los distintos grupos de micobacterias por cromatografía gaseosa (CG)

Grupos de Micobacterias	Parámetros evaluados para su clasificación		
	Porcentaje de EMAG ¹	Suma de porcentajes de EMAG	Relación entre los porcentajes de EMAG
No cromógenas de crecimiento lento	TBE ²	C18:1 + C18:2	C18:1 + C18:2/C16:0
	C16:1	C22:0 + C24:0 + C26:0	C18:0/TBE
	C17:0	-	C16:1/TBE
Cromógenas de crecimiento lento	C14:0	C22:0 + C24:0 + C26:0	C22:0/C24:0
	C16:1	-	C24:0/C26:0
	C18:0	-	-
De rápido desarrollo	Pico 12,8	-	C18:0/TBE

¹ EMAG: ésteres metílicos de ácidos grasos

² TBE: tuberculoestearato

mientos correspondieron: 65 a *M. tuberculosis*, 49 al MAC, 25 a *M. bovis*, cinco a *M. gastri*, siete al grupo *M. terrae-M. triviale*, tres a *M. kansasii*, 15 a *M. fortuitum*, ocho a *M. chelonae*, dos a *M. smegmatis*, dos a *M. flavescens* y dos a *M. scrofulaceum*. A partir del primocultivo se hizo una suspensión de una "ansada" de colonias (entre 1 y 2 mg) en 0.5 ml de agua destilada estéril. Se agitó durante dos minutos para homogeneizar y luego se inactivó la muestra durante 70 min en un baño de agua a 70°C²¹.

Tratamiento de la muestra. Las muestras inactivadas fueron saponificadas con 4 ml de una solución de Hook en metanol 0.5M durante 30 min a 80°C. El material insaponificable se extrajo con hexano (Merck) y se descartó. El residuo se acidificó con SO₄H₂ 15% hasta pH 2; los AG fueron extraídos con éter de petróleo y luego de evaporar el solvente fueron esterificados con la mezcla metilante HCl-metanol 1N a 80°C durante 30 min^{19, 22}. Los ésteres metílicos fueron extraídos con hexano y, luego de lavarlos con *buffer* de fosfatos 0.3M (42.57 g de PO₄HNa₂ y 12.0 g de HONa por litro de agua, pH 11-12), se evaporó el solvente a sequedad y se redisolvió el residuo con 1 ml de hexano¹⁹.

Cromatografía gaseosa de AG celulares y PDAM. Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo Konik modelo 3 000HRGC equipado con un detector de ionización de llama. Se utilizó una columna capilar CP-Sil5CB de 50 m de longitud y 0.32 mm de diámetro interno (Chrompack). La temperatura de la columna fue programada desde 200°C hasta 275°C con un incremento de 5°C/min y fue mantenida a 275°C durante 15 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 285°C. El gas *carrier* fue hidrógeno, con una velocidad de flujo de aproximadamente 1 ml por min.

Los picos cromatográficos fueron identificados comparando los tiempos de retención con patrones de referencia de los siguientes ésteres metílicos de AG (EMAG): mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), margárico (C17:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), araquídico (C20:0), docosanoico (C22:0), tetracosanoico (C24:0) y hexacosanoico (C26:0). El éster metílico del ácido tuberculoestearico (10-metil octadecanoico) fue identificado en dos muestras empleando CG-EM; en las demás muestras, al no contar con el patrón correspondiente, se lo identificó a través de su tiempo de retención (Tr) relativo con respecto al palmitato de metilo.

Identificación de especies por CG: Una vez que las muestras fueron adecuadamente cultivadas, procesadas y analizadas, se categorizaron en tres grupos de acuerdo a las características de crecimiento: 1) no cromógenas de crecimiento len-

to, 2) cromógenas de crecimiento lento y 3) de crecimiento rápido. Para cada grupo, se empleó un diagrama de flujo específico basado en la comparación de los porcentajes de EMAG de la cepa en estudio con respecto a los valores medios obtenidos para cada especie en el estudio previo realizado con muestras clínicas y cepas patrones¹⁹. En algunos casos se consideró, en lugar de los porcentajes de los EMAG, la relación entre dos EMAG o la suma de dos o tres de ellos. En la Tabla 1 se observan los parámetros considerados para la clasificación de los distintos grupos de micobacterias. En las micobacterias de rápido desarrollo se analizó la relación entre estearato y tuberculoestearato y el porcentaje de un pico no identificado con un Tr absoluto cercano a 12.8 min en las condiciones del presente trabajo.

Expresión de los resultados: Los resultados se expresaron como correctos, incorrectos o no clasificables (NC). Para asignarle a un aislamiento una clasificación dada, éste debía coincidir en, al menos, el 90% de los parámetros evaluados; el resto se consideró NC.

Reproducibilidad de los ensayos: Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. A la vez, cada aislamiento fue probado en dos o más ensayos independientes.

Resultados

De los 183 aislamientos estudiados, 126 (69%) resultaron correctamente clasificados, 10 (5%) lo fueron incorrectamente y 47 (26%) no pudieron ser clasificados.

En la Tabla 2 se pueden observar los resultados de la tipificación empleando CG. En el grupo de especies no cromógenas de desarrollo lento, al cual se hará referencia a continuación, se incluyen las tres especies de mayor incidencia en Argentina, *M. tuberculosis*, *M. bovis* y Complejo MAC. Los resultados correspondientes a los aislamientos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, fueron considerados correctos siempre que ubicasen a dichas especies dentro del MTC. De los 154 aislamientos, 101 (66%) resultaron correctamente clasificados y ocho (5%) fueron identificados incorrectamente. Si se consideran únicamente los aislamientos clasificables, 101/109 (93%) fueron correctamente identificados e incorrectamente 8/

TABLA 2.- Resultados de la tipificación de micobacterias por cromatografía gaseosa (CG)

Grupo	Especie	Correcta		Tipificación Incorrecta		No clasificable	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
No cromógenas de crecimiento lento (n = 154)	<i>M. tuberculosis</i> (n = 65)	40	62	0	0	25	38
	Complejo MAC (n = 49)	39	80	4	8	6	12
	<i>M. bovis</i> (n = 25)	15	60	1	4	9	36
	Grupo <i>M. terrae</i> - <i>M. triviale</i> (n = 7)	7	100	0	0	0	0
	<i>M. gastri</i> (n = 5)	0	0	2	40	3	60
	<i>M. kansasii</i> (n = 3)	0	0	1	33	2	67
	Cromógenas de crecimiento lento (n = 4)	<i>M. flavescens</i> (n = 2)	2	100	0	0	0
<i>M. scrofulaceum</i> (n = 2)		0	0	0	0	2	100
De crecimiento rápido (n = 25)	<i>M. fortuitum</i> (n = 15)	15	100	0	0	0	0
	<i>M. chelonae</i> (n = 8)	8	100	0	0	0	0
	<i>M. smegmatis</i> (n = 2)	0	0	2	100	0	0
Total (n = 183)		126	69	10	5	47	26

109 (7%). El aislamiento de *M. bovis* que fue incorrectamente clasificado se identificó por CG como Complejo MAC, mientras que las cuatro cepas del MAC mal clasificadas fueron identificadas como *M. tuberculosis*. El aislamiento de *M. kansasii* incorrectamente identificado fue clasificado como MAC. Es necesario aclarar que *M. kansasii* fue incluido en los diagramas de flujo de este grupo y también en el de micobacterias cromógenas de crecimiento lento.

Considerando la prevalencia de MNT entre pacientes coinfectados con HIV, en el servicio con mayor atención de estos casos en Argentina (Di Lonardo *et al*), se pudo calcular el valor predictivo de la técnica de CG para esta población⁹. Para el MTC, con una prevalencia del 93.7% entre los coinfectados con el HIV, el valor predictivo positivo (VPP) resultó del 99.3% y el valor predictivo negativo (VPN) del 86.1%. Para el MAC, cuya prevalencia es del 5.8% entre los coinfectados con el HIV, el VPP resultó del 54.8% y el VPN del 98.7%.

De los 25 aislamientos correspondientes a las especies de rápido desarrollo estudiadas, 23 (92%) fueron correctamente identificados; las dos cepas incorrectamente identificadas correspondieron a *M. smegmatis* y fueron clasificadas como *M. fortuitum*.

Entre las micobacterias cromógenas de crecimiento lento, los dos aislamientos de *M. flavescens* fueron correctamente clasificados, mientras que los dos de *M. scrofulaceum* resultaron NC.

Discusión

Varios informes han destacado el valor de la CG en la identificación de especies. No obstante, los métodos empleados, al igual que los resultados obtenidos, son variados; en algunos casos se ha descrito el empleo de *software* acoplado al cromatógrafo gaseoso, el cual no es económicamente accesible en los países en vías de desarrollo^{16, 18, 23}.

Dada la necesidad de identificar rápidamente los aislamientos micobacterianos de pacientes inmunosuprimidos en Argentina, a fin de darles el tratamiento terapéutico adecuado lo antes posible, en un trabajo previo se caracterizaron los AG y PDAM de la pared celular de distintas especies micobacterianas para estandarizar una técnica de tipificación rápida de micobacterias empleando CG¹⁹. En el presente trabajo se determinó la especificidad y aplicabilidad de la técnica estandarizada con respecto a las pruebas bioquímicas clásicas.

Teniendo en cuenta todos los aislamientos micobacterianos estudiados, el 69% de ellos resultó correctamente clasificado, valor muy parecido al 63% obtenido por Smid y Salfinger, al 67% de Tisdall et al. y al 63% de Mayall^{16, 24, 25}. Si se excluyen los aislamientos que resultaron NC, 93% fueron correctamente clasificados; en el caso del MTC, este valor resultó del 98%, pero hubo un 38% de aislamientos NC, lo cual disminuye la sensibilidad de la técnica al 61%. Si se hace referencia exclusivamente a *M. tuberculosis*, todos los aislamientos fueron correctamente identificados.

Si se analiza específicamente el grupo de micobacterias no cromógenas de crecimiento lento y se tiene en cuenta que el 98.3% de los aislamientos de enfermos con TBC y otras micobacteriosis en la provincia de Santa Fe corresponden al MTC (datos no publicados), el VPP sería del 99.8%. Si, en cambio, se considera la prevalencia del MTC entre los coinfectados con el HIV (93.7%), el VPP de la técnica resultaría del 99.3%. En ambos casos, un resultado positivo por CG permitiría concluir casi con absoluta certeza que se está en presencia de un aislamiento correspondiente al MTC. Los aislamientos de MAC, especies cuya incidencia en Argentina varió desde un 0.36% entre 1982 y 1984 en población general, hasta un 8.8% en los pacientes con SIDA, resultaron correctamente clasificados en el 96% de los casos^{6, 7, 10}. Los cuatro aislamientos de MAC incorrectamente clasificados como *M. tuberculosis* representan sólo el 8%. Si se considera la prevalencia de MAC del 0.3% en los pacientes no sospechados de estar infectados con HIV, el VPN resulta del 99.9%⁹.

Entre los coinfectados con el HIV el VPN en el MAC también es alto (98.7%), lo cual sería casi concluyente de que un resultado negativo no corresponde a un aislamiento de MAC. El VPP, en cambio, mejora al aplicarlo en poblaciones con mayor prevalencia de MAC. El 92% de los aislamientos de rápido desarrollo fue identificado correctamente.

Los aislamientos correspondientes al grupo *M. terrae-M. triviale*, comúnmente no patógenos, fueron todos correctamente identificados, mientras que los aislamientos de *M. gastri* o resultaron NC o fueron incorrectamente clasificados como MAC, coincidiendo con lo expresado por Tisdall, quien encontró perfiles lipídicos relacionados entre estas especies²⁴.

Como el Programa Nacional de Control de la TBC de Argentina recomienda aplicar un tratamiento con drogas de primera línea para TBC en todos los casos de baciloscopia y/o cultivo positivo en pacientes sin antecedentes de tratamiento previo, esta tipificación rápida permitiría, en los pacientes inmunosuprimidos con enfermedad debida a MAC, hacer un cambio en el esquema de tratamiento entre dos o cuatro semanas antes de lo que hubiesen permitido las pruebas bioquímicas clásicas.

Este estudio demuestra que el uso de la CG en la identificación rápida de micobacterias en Argentina, un país con mediana prevalencia de TBC, posibilitaría implementar o modificar rápidamente el tratamiento terapéutico de los pacientes inmunosuprimidos. Teniendo en cuenta que existen, aunque en pequeña proporción, casos discordantes, sería conveniente corroborar los resultados de la tipificación rápida mediante las técnicas clásicas.

Ya que Argentina dispone de una red de laboratorios de TBC consolidada, el uso de esta técnica en el laboratorio de referencia permitiría complementar los estudios con sondas moleculares que se están realizando actualmente, poniendo a disposición de toda la red una técnica de alta complejidad, rápida y de alto valor predictivo. Si bien el equipamiento es caro y se necesita de personal técnico especializado, esto no constituye un problema en las condiciones actuales ya que se cuenta con el equipamiento necesario y el personal capacitado, resultando el costo de procesamiento no superior al que demandan las sondas de ADN. Además, el disponer de esta técnica, permitiría también caracterizar especies nuevas o detectar variantes autóctonas de especies conocidas.

Agradecimientos: Este trabajo fue subsidiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. Se agradece a la Dra. Viviana Ritacco por su colaboración en la lectura crítica del manuscrito.

Bibliografía

1. Kochi A. The global tuberculosis situation and the control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991; 72: 1-6.
2. Horsburgh Jr CR. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1991; 324: 1332-8.
3. Kox LFF. Tests for detection and identification of mycobacteria. How should they be used? *Respiratory Medicine* 1995; 89: 399-408.
4. Wolinsky E. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 1-12.
5. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Emilio Coni". Tuberculosis por jurisdicción-Argentina - 1980-1997, (EP.TB 15/98), Santa Fe 1998.
6. Barrera L, Kantor IN de. Non tuberculous mycobacteria and *Mycobacterium bovis* as a cause of human disease in Argentina. *Trop and Geogr Med* 1987; 39: 222-7.
7. Barrera L, Kantor IN de, Salinas A. Diseases due to mycobacteria other than *M. tuberculosis* in human population. Argentina, 1982-1984. En: Casal M (ed), *Mycobacteria of Clinical Interest*, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1986; pp 286-9.
8. Morcillo N, Buide A, Scipione S, Waisman D, Kantor IN de. Diagnóstico de tuberculosis en pacientes con SIDA: valor predictivo de la baciloscopia. *Respiración* 1995; 10: 32-6.
9. Di Lonardo M, Isola NC, Ambroggi M, Rybko A, Poggi, S. Mycobacteria in HIV-infected patients in Buenos Aires. *Tubercle Lung Dis* 1995; 76: 185-9.
10. Pérez H, Kaufman S, Ben G, Barrera L y Cahn P.

- Micobacterias no tuberculosas en el paciente con SIDA. II Congreso Argentino de SIDA, Buenos Aires, 1995.
11. Tsukamura M. A review of the methods of identification and differentiation of mycobacteria. *Rev Infect Dis* 1981; 3: 841-61.
 12. Saito H, Tomioka H, Sato K, Tasaka H, Dawson DJ. Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* complex by using DNA probes specific for *Myobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1694-7.
 13. Minnikin DE, Hutchinson IA, Caldicott AB, Goodfellow. Thin-layer chromatography of methanolysates of mycolic acid containing bacteria. *J Chromatogr* 1980; 188: 221-33.
 14. Luquin M, Ausina V, López Calahorra F et al. Evaluation of practical chromatographic procedures for identification of clinical isolates of Mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 120-30.
 15. Glickman S, Kilburn J, Butler W, Ramos S. Rapid identification of mycolic acid patterns of mycobacteria by high-performance liquid chromatography using pattern recognition software and a *Mycobacterium* library. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 740-5.
 16. Smid I, Salfinger M. Mycobacterial identification by computer aided gas-liquid chromatography. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 19: 81-8.
 17. Yassin AF, Brzezinka H, Schaal KP. Cellular fatty acid methyl ester profiles as a tool in the differentiation of members of the genus *Mycobacterium*. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1993; 279: 316-29.
 18. Maliwan N, Reid R, Pliska S, Bird T, Zvetina J. Identifying *Mycobacterium tuberculosis* cultures by gas-liquid chromatography and a computer-aided pattern recognition model. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 182-7.
 19. Zerbini E, Cardoso M, Sequeira M et al. Caracterización de ácidos grasos y productos de degradación de ácidos micólicos en especies micobacterianas de mayor incidencia en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 1997, 29: 184-94.
 20. Casal Román M. Tipificación de las micobacterias. En: Casal Román M (ed), *Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias (Tuberculosis, Lepra y Micobacteriosis)*, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, España, 1990. pp 83-131.
 21. Lambert MA, Moss CW, Silcox VA, Good RC. Analysis of mycolic acid cleavage products and cellular fatty acids of *Mycobacterium* species by capillary gas chromatography. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 731-6.
 22. Franotovic M, Todoric A, Petrovic J. Gas chromatographic analysis of fatty acids and identification of tuberculostearic acid in *Mycobacterium tuberculosis* by using gas-chromatography-mass spectrometry. *Period Biol* 1991; 93: 397-403.
 23. Guerrant GO, Lambert MA, Moss CM. Gas chromatographic analysis of mycolic acid cleavage products in mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 899-907.
 24. Tisdall F, Roberts G, Anhalt J. Identification of clinical isolates of Mycobacteria with gas liquid chromatography alone. *J Clin Microbiol* 1979; 10: 506-14.
 25. Mayal BC. Rapid identification of mycobacteria using gas liquid chromatography. *Pathology* 1985; 7: 24-8.

Toda educación depende de la filosofía de la cultura que la presida; y debido a estos obsecuentes imitadores de los "países avanzados" –avanzados en qué?– corremos el peligro de propagar aún más la robotización. Debemos oponernos al vaciamiento de nuestra cultura, devastada por esos economicistas que sólo entienden de Producto Bruto Interno –jamás una expresión tan bien lograda–, que están reduciendo la educación al conocimiento de la técnica y de la informática, útiles para los negocios, pero carente de los saberes fundamentales que revela el arte.

Ernesto Sábato

Antes del fin. Buenos Aires: Seix Barral, 1998, p 127