

Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos

Paola Toledo Ordoñez*

Feliciano Milian Sauzo*

Marco Antonio Santillan Flores**

Isaura Carolina Ramírez Casillas**

Abstract

In order to identify through microbiological methods the presence of mycobacteria in sputum samples of human patients with chronic respiratory problems, nine Ziehl-Neelsen (ZN) positive, and forty one ZN negative sputum samples from patients with chronic respiratory disease were included in the study. Each sample was cultured in both, Lowenstein-Jensen with glycerol and Stonebrink with pyruvate medium. After at least 8 weeks at 37°C, the nine ZN positive samples were also positive to culture, and from the forty one ZN negative group, ten (24%) were positive to culture. Thirteen out of all the cultures were identified as *Mycobacterium tuberculosis*, 3 as *M. Bovis*, and in 3 of the cultures, both *M. tuberculosis* and *M. bovis* were found in the same tube. The fact that 24% of the ZN negative group were culture positive, shows the importance of including mycobacteria culture in the routine diagnosis of tuberculosis. More than that, whenever possible, biochemical identification of species should be included, since patients infected with *M. bovis* will not respond appropriately to the pyrazinamide treatment.

KEY WORDS: *microbiology, epidemiology, m. bovis, m. tuberculosis, human sputum samples.*

Resumen

Se realizó un estudio bacteriológico en 9 muestras con examen de esputo positivo y 41 muestras con examen de esputo negativo, obtenidas de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos, con tos persistente y mala respuesta al tratamiento contra tuberculosis. Las muestras se sembraron por duplicado en los medios de cultivo de Lowenstein-Jensen y Stonebrink. Todas las 9 muestras con examen positivo a ZN fueron también positivas al aislamiento de micobacterias; de las 41 muestras negativas a ZN, 10 (24.0%) fueron también positivas al aislamiento. Trece de estos crecimientos se identificaron como *M. tuberculosis*, tres correspondieron a *M. bovis* y en tres se identificó un crecimiento mixto que correspondió a ambas micobacterias. El hecho de que 24.0% de las muestras negativas al examen de frotis de esputo resultaran positivas al cultivo remarca la importancia del diagnóstico por aislamiento de la micobacteria. Además del aislamiento, la tipificación bioquímica también es importante ya que esto decidirá el tratamiento apropiado debido a que *M. bovis* es naturalmente resistente a la pirazinamida.

PALABRAS CLAVE: *microbiología, epidemiología, mycobacterium bovis, m.tuberculosis, frotis de estupo humano.*

Introducción

La infección con *Mycobacterium bovis* es responsable de aproximadamente 7 000 nuevos casos de tuberculosis humana por año en América Latina¹. El problema se agudiza debido a que los pacientes positivos al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son más susceptibles a infecciones con *M. bovis*². En Estados Unidos se ha descrito que la inmigración de poblaciones de alto riesgo y la infección con el VIH en la actualidad han revertido la

tasa del 5% de decremento en la incidencia anual^{3,4,5,6}. Dankner et al.⁷ ponen de manifiesto la importancia de *M. bovis* en infecciones en humanos en un trabajo realizado en inmigrantes mexicanos, en donde 73 pacientes enfermaron de tuberculosis por este agente. La información epidemiológica sobre el impacto de la tuberculosis bovina en la salud humana sigue siendo escasa, principalmente porque el diagnóstico de la tuberculosis en humanos generalmente se limita al examen del frotis de esputo, y aun cuando el cultivo

Recibido el 17 de junio de 1998 y aceptado el 22 de febrero de 1999.

*Centro Experimental de Querétaro, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pedro de Gante 20, Querétaro, Querétaro, México.

**CENID- Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Km.15.5 Carretera Libre México-Toluca, Palo Alto, D.F. Cuajimalpa, 05110, México.

bacteriológico se lleve a cabo, la adición de glicerol al medio de Lowenstein-Jensen dificulta el crecimiento de *M. bovis*.⁸ Otra limitante es que los casos de infección pulmonar causados por las cepas bovina o humana del bacilo tuberculoso, son indistinguibles desde los puntos de vista clínico, radiológico y patológico.⁹ La aparente disminución en la incidencia de tuberculosis en humanos, en algunos países desarrollados, después de los programas de erradicación de la tuberculosis bovina, fue el resultado de la falla o reticencia de muchos laboratorios de diagnóstico para diferenciar entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*,¹⁰ y en muchos países en desarrollo, debido al alto costo que representa la bacteriología. Una de las razones para no llevar a cabo la diferenciación entre cepas fue la efectividad de la terapia antituberculosa, ya que ambos tipos de bacilos eran igualmente susceptibles a los medicamentos. La situación ha cambiado desde que la pirazinamida surge como un medicamento de primera línea, al que *M. bovis* es naturalmente resistente, por lo que esta diferenciación sí tiene impacto sobre el tratamiento de la enfermedad.¹¹ El objetivo de este trabajo fue identificar por métodos bacteriológicos, las micobacterias presentes en muestras de expectoración de pacientes con problemas respiratorios crónicos.

Material y métodos

Muestras

El estudio se realizó con un total de 50 muestras de expectoración obtenidas de humanos. Nueve muestras fueron positivas al examen de frotis de esputo y 41 muestras fueron negativas a este mismo examen.

De estas muestras, 36 (72%) correspondieron a pacientes del sexo masculino, con una edad promedio de 46 años (edad mínima 28 años y edad máxima 70 años) y 14 (28%) a pacientes del sexo femenino, con una edad promedio de 48 años (edad mínima 28 años y edad máxima 66 años), cuatro muestras venían sin ninguna información. Los pacientes presentaron un cuadro de tos crónica y mala respuesta al tratamiento contra tuberculosis. A cada paciente se le había realizado cuando menos una serie de tres frotis de esputo, que es la prueba practicada rutinariamente en casos de pacientes sospechosos de padecer tuberculosis;¹² uno de los pacientes con examen de esputo positivo presentó serología positiva a VIH.

Estudio bacteriológico

Cada muestra se descontaminó según el método de Petroff¹³ y se sembró por duplicado en los medios de cultivo de Lowenstein-Jensen con glicerol, y Stonebrink con piruvato de sodio; se incubó a 37°C y se observó el crecimiento hasta las ocho semanas. A los crecimientos sospechosos se les realizó el primer nivel de identificación basado en la morfología de las colonias, afinidad tintorial y morfología de los bacilos, velocidad de desarrollo,

pigmentación y producción de niacina, y posteriormente se identificaron siguiendo el método descrito por Payeur et al.¹³ Para determinar los valores de sensibilidad y especificidad de las pruebas de ZN y cultivo bacteriológico se utilizaron las siguientes fórmulas.¹⁴

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VN} = \frac{(a)}{(a+c)} \quad \text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FN} = \frac{(d)}{(b+d)}$$

Resultados

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: De un total de 19 crecimientos (38%), nueve correspondieron al total de muestras con examen de esputo positivo, y 10 (24.0%) correspondieron a parte de las muestras con examen de esputo negativo. En 31 (75.6%) de las muestras con esputo negativo no hubo crecimiento.

Trece de estos crecimientos se identificaron como *Mycobacterium tuberculosis*, tres correspondieron a *M. bovis*, y en tres se identificó un crecimiento mixto que correspondió a *M. tuberculosis* y *M. bovis*. El crecimiento de *M. tuberculosis* fue abundante en los tubos con medio de Lowenstein-Jensen adicionado con glicerol, no así en los tubos con medio de Stonebrink, que no contenía glicerol, en donde el crecimiento fue escaso. Por otro lado, en el medio de Lowenstein-Jensen los crecimientos de *M. bovis* estuvieron ausentes en dos de los casos, y con crecimiento muy escaso en los cuatro casos restantes. Un resultado interesante fue que el paciente que tenía serología positiva a VIH, mostró crecimiento de *M. bovis* en el cultivo. Los valores de sensibilidad de la prueba de ZN fueron de 47%, con un intervalo de confianza de 95% y la especificidad fue de 100% (Cuadro 1).

Discusión

La diferencia en crecimiento en los medios de cultivo, observada en el presente trabajo, concuerda con lo mencionado por autores como Grange y Yates¹⁵, quienes mencionan poco o nulo crecimiento de *M. bovis* en los medios de cultivo adicionados con glicerol. Por otro lado, se ha establecido que en el mundo, 60 millones de personas sufren de tuberculosis activa, de las cuales mueren de 2 a 3 millones de personas; se considera que estas muertes son ocasionadas por *M. tuberculosis*.¹⁶ Sin embargo, la falta del diagnóstico diferencial hace pensar que muchos de estos diagnósticos de tuberculosis pudieran ser causados por *M. bovis*.⁶ Lo anterior se infiere de los resultados obtenidos en el presente trabajo, en donde tres de los aislados puros y tres de los aislados mixtos obtenidos correspondieron a *M. bovis* y no a *M. tuberculosis*. El hecho de haber aislado, a partir de la misma muestra, *M. tuberculosis* y *M. bovis* no queda muy claro y podría explicarse parcialmente con lo mencionado por Lumb y Shaw¹⁷, así como por Smith et al.¹⁸, quienes documentaron que después de meses o años de la inmunización con BCG, observaron que existen

CUADRO 1

VALORES DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TINCION DE ZN EN 50 MUESTRAS DE ESPUTO DE HUMANOS COMPARANDOLO CON EL ESTUDIO BACTERIOLOGICO.			
Cultivo bacteriológico			
	+	-	Totales
Zn	+	9	0
	-	10	31
Totales	19	31	50
Sensibilidad de Zn 9/19= 47.36%			
Especificidad de Zn 31/31 = 100%			

complicaciones en pacientes infectados con VIH. También se menciona la posible diseminación de *M. bovis*-cepa BCG en pacientes con sintomatología clínica de VIH.^{4,18,19} Es interesante el hecho de que 10 de las muestras negativas al examen de frotis de esputo resultaron positivas al cultivo. Si se considera el cultivo bacteriológico como la "prueba de oro", la sensibilidad de la técnica de Ziehl-Neelsen es de sólo el 47%, aunque tenga una especificidad de 100% (Cuadro 1). Este resultado tiene una alta implicación epidemiológica, ya que significaría que pacientes sospechosos a tuberculosis son enviados a sus hogares como libres de la enfermedad y sin ningún tratamiento. Consecuentemente, estos pacientes se convierten en focos de infección para aquellas personas que viven con ellos, además de todas aquellas personas con las que por diferentes razones comparten espacios cerrados. Por otro lado, la tipificación bacteriológica del agente causal influirá de manera definitiva en el tratamiento. Por lo tanto, se sugiere que la tipificación bacteriológica como método de diagnóstico definitivo debería ser implantada en todos los centros de salud en México, si el problema de tuberculosis humana ha de ser reducido.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer su apoyo a los doctores Alberto Mejía Damián, del Instituto Mexicano del Seguro Social; Efrén Díaz Aparicio y Germán Valero Elizondo, del CENID-Microbiología por la revisión del manuscrito.

Referencias

1. Kantor NI, Álvarez E. Situación de la tuberculosis bovina en América Latina. Publicación especial No.10. Martínez, Argentina: Panamericano de Zoonosis, Organización Mundial de la Salud, 1990.
2. Darbon CJ, Grange JM. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. Br Vet J 1993;149:405-417.
3. Barnes PF, Bloch AB, Davidson PT, Snider DE. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med 1991; 324: 1644-1650.
4. Centers of Disease Control. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection: recommendations of the advisory committee for the elimination of tuberculosis. Morb Mortal Wkly Rep 1989;38:236-238.
5. Quinn TC. Interaction of the human immunodeficiency virus and tuberculosis and the implications for BCG vaccination. Rev Infect Dis 1989;11(Suppl 2):379-384.
6. Reider HL, Cauthen GM, Kelly GD, Bloch AB, Snider DE. Tuberculosis in the United States. J Am Med Assoc 1989;262:385-389.
7. Dankner WM, Waecker JN, Essey AM, Moser K, Thompson M, Davis ECh. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicopneumologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. Medicine 1993;72:11-37.
8. Carter GR, Chengappa MM. Bacteriología y micología veterinarias. Aspectos esenciales. 2^a ed. México (DF): El Manual Moderno, 1994.
9. Worthington RW, Kleeberg HH. Practical problems in tuberculin testing in cattle. J S Afr Vet Assoc 1965;37:177-183.
10. Collins CH, Grange JM. A review: the bovine tubercle bacillus. J Appl Bacteriol 1983;55:13-29.
11. Konno K, Feldman FM, McDermott W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacillus. Am Rev Respir Dis 1967;95:461-469.
12. Secretaría de Salud. NOM-006-55A2-1993 para la prevención de la tuberculosis en la atención primaria de la salud. Diario Oficial de la Federación. México (DF): 26 de enero de 1995.
13. Payeur JB, Jarnagin JL, Marquardt JG, Schaper AL, Martin, MB. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of mycobacteria. Ames (Ia): United States Department of Agriculture, 1993.
14. Morilla GA, González VD. Introducción al diagnóstico inmunológico de las enfermedades de los animales domésticos. México (DF): Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, 1998.
15. Grange MJ, Yates DM. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. Vet Microbiol 1994;40:137-151.
16. Styblo K. Overview and epidemiologic assessment of the current global tuberculosis situation with an emphasis on control in developing countries. Rev Infect Dis 1989;2 (Suppl 2):339-346.
17. Lumb R, Shaw D. *Mycobacterium bovis* (BCG) vaccination. Progressive disease in a patient asymptotically infected with the human immunodeficiency virus. Austr Med J 1992;156:286-287.
18. Smith E, Thybo S, Bennedsen J. Infection with *Mycobacterium bovis* in a patient with AIDS: a late complication of BCG vaccination. Scand J Infect Dis 1992;24:109-110.
19. Von Reyn CR, Clements CJ, Man JM. Human immunodeficiency virus infection and routine childhood immunisation. Lancet 1987;2:669-672.