

Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen 51
Volume

Número 2
Number

Abril-Junio 2004
April-June

Artículo:

Ventajas del cultivo en un equipo automatizado y la prueba de PCR para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Federación Mexicana de Patología Clínica, AC

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Ventajas del cultivo en un equipo automatizado y la prueba de PCR para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*

Palabras clave: *Mycobacterium*, tuberculosis.

Key words: *Mycobacterium*, tuberculosis.

Recibido: 03/12/2003
Aceptado: 21/01/2004

Reynerio Fagundo Sierra,* María Antonieta Cerros Santos,* Esther Herrera Pérez*

* Departamento de Microbiología. Carpermor S.A. de C.V. Laboratorio de Referencia Internacional.

Correspondencia:

Dr. Reynerio Fagundo Sierra
Alfonso Herrera No. 75. Colonia San Rafael.
CP. 06470. México, D.F.
Tel: (55)5140-7600 ext. 52230 Fax: (55)5546-5230.
E-mail: rfagundo@carpermor.com.mx

70

Resumen

De la importancia actual que ha recobrado la tuberculosis surge la necesidad de encontrar nuevas herramientas que permitan un diagnóstico más rápido y específico como una medida con impacto en el control de la enfermedad. El Departamento de Microbiología de Carpermor, Laboratorio de Referencia Internacional, ha adoptado nuevas tecnologías para realizar el diagnóstico de tuberculosis, utilizando el cultivo automatizado, la identificación del microorganismo mediante PCR y el antibiograma. El presente trabajo presenta la experiencia en la evaluación de 369 muestras de pacientes procedentes de diferentes puntos de la república mexicana que fueron recibidos en el laboratorio solicitando el cultivo para la búsqueda de *Mycobacterium*, en un periodo de 18 meses. Se aislaron 44 cepas de *Mycobacterium*, determinando la positividad de los cultivos en un promedio de 21 días. A las cepas aisladas, se les realizó la caracterización mediante el método de PCR y el antibiograma a las tres drogas de primera línea empleadas en el tratamiento antituberculoso (isoniacida, rifampicina y etambutol), en 82% de las cepas, la prueba de PCR fue positiva y en 18% fue negativa, lo que demuestra la importancia de esta prueba para evitar falsos diagnósticos de tuberculosis. Cuarenta y tres por ciento de las cepas mostraron resistencia a dos o a las tres drogas evaluadas (multidrogorresistencia).

Summary

Because of tuberculosis recovered importance, the need to find new faster and specific diagnostic tools as an impact measure for disease control, has arisen. Our Laboratory has adopted new technologies as PCR microorganism identification, automated culture and antimycobacterial susceptibility test to achieve tuberculosis diagnosis. The present work shows our experience in evaluating 369 patient's samples for *Mycobacterium* detection by automated culture means. Samples came from different places of Mexico country in a total period of eighteen months. By automated culture were isolated 44 positive samples to *Mycobacterium* in an average time of 21 days each one. This isolates then were submitted to PCR characterization and antimycobacterial susceptibility test against isoniazid, rifampin and ethambutol, the first three drugs of choice for treatment. PCR was positive in 82% of isolates demonstrating the importance of this test in detecting false-positive diagnosis of tuberculosis. Forty three per cent of isolates showed resistance against 2 or 3 of the evaluated drugs (multi-drug resistance).

Introducción

Las micobacterias pertenecen al orden *Actinomycetales*, familia *Mycobacteriaceae*. Son bacilos delgados, aerobios, no esporulados, no capsulados e inmóviles. Aunque no se tiñen con facilidad, una vez que captan el colorante (fucsina fenicada con calor) resisten a la decoloración con alcohol acidificado y por ello se les llaman bacilos ácido-alcohol resistentes.¹

El género *Mycobacterium* incluye más de 100 especies. Su taxonomía y clasificación es compleja y está en constante revisión. A finales de la década del 50, a medida que se iban encontrando con mayor frecuencia en la práctica médica especies de micobacterias distintas de *M. tuberculosis*, Runyon propuso agrupar estos microorganismos "atípicos" sobre la base de su velocidad de crecimiento y producción de pigmentos. Los avances en genética sugieren una clasificación de orientación clínica de las micobacterias en dos grandes grupos: complejo *M. tuberculosis* (incluye las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*), productoras todas ellas de tuberculosis en humanos y complejo MOTT (otras micobacterias diferentes al complejo *M. tuberculosis*) que no causan tuberculosis, pero pueden causar enfermedad fundamentalmente en individuos inmunocomprometidos. La mayoría de las micobacterias diferentes a *M. tuberculosis* se aislan a partir del agua y del suelo, pero pueden ser colonizadoras habituales de superficies mucosas corporales o ser contaminantes en el laboratorio; por este motivo, es muy importante su identificación correcta para evitar falsos diagnósticos y tratamientos costosos.^{2,3}

La localización más frecuente de tuberculosis en el adulto inmunocompetente es la pulmonar. Por lo común, se presenta como una enfermedad de curso subagudo caracterizada por fiebre de bajo grado de predominio vespertino, tos persistente, sudoración nocturna, expectoración y, raras veces, hemoptisis. Radiológicamente, suele observarse un infiltrado en lóbulos superiores, con frecuen-

cia cavitado, y no siendo raro el derrame pleural como única manifestación radiológica. Ocasionadamente, en las personas inmunocompetentes, la tuberculosis puede presentarse con afectación extra-pulmonar o diseminada; éstas son, sin embargo, las formas clínicas más frecuentes en las personas con SIDA o inmunocomprometidas por otras causas.⁴

En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la tuberculosis como una enfermedad emergente. En la actualidad se estima que dos mil millones de personas están infectadas con *M. tuberculosis* y otras especies de *Mycobacterium* y que más de dos millones de personas mueren anualmente por complicaciones de esta enfermedad en todo el mundo. Se calcula que hay ocho millones de nuevos casos cada año, 95% de los cuales aparecen en países en vías de desarrollo, con una incidencia que se ha elevado en los últimos años. La epidemia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, el aumento de la indigencia en los grandes centros urbanos y la inmigración de habitantes de áreas geográficas con alta prevalencia de tuberculosis se han señalado como las causas más importantes que han contribuido a revertir la curva decreciente de nuevos casos de tuberculosis que se venía observando en los países occidentales. La OMS estima que se infectarán cerca de mil millones de personas en los próximos 20 años, si no se llevan a cabo medidas para controlar la enfermedad.^{5,6} En México, la tuberculosis es un problema importante de salud pública y está incluida entre las primeras 20 causas de muerte.⁷

Actualmente, las tasas de morbilidad y mortalidad están aumentando a medida que han aparecido cepas de *Mycobacterium* resistentes a múltiples drogas. Un tratamiento correcto ofrece a los pacientes muchas posibilidades de curarse, pero el uso inadecuado de los fármacos antituberculosos puede dar lugar a un gran número de enfermos crónicos que transmiten bacilos resistentes a los fármacos.^{8,9}

Los objetivos de este estudio fueron conocer el tiempo promedio de cultivo en el equipo ESP Cul-

ture System II, determinar cuántas de las cepas aisladas son realmente *M. tuberculosis* utilizando el método de PCR y su susceptibilidad y resistencia a las drogas antifímicas de primera línea.

Material y métodos

Se analizaron 369 muestras de pacientes procedentes de diferentes puntos de la república mexicana recibidas durante 18 meses en el Departamento de Microbiología de Carpermor, solicitando el cultivo para la búsqueda de *Mycobacterium*. A todas las muestras se les realizó el examen microscópico directo (baciloscopía) por el método de Zhiel-Neelsen, siguiendo la Nota Técnica Núm. 26/Rev. 1 OPS/OMS.¹⁰ La descontaminación de las mismas se realizó con hidróxido de sodio al 4% (método de Petroff), según la Nota Técnica Núm. 27 OPS/OMS.¹¹

Se realizó el cultivo utilizando el caldo Middlebrook 7H9 suplementado con 0.5 mL de polimixina B (1,500 unidades), vancomicina (90 µg), ácido nalidíxico (600 µg) y anfotericina B (150 µg) más 1 mL de suplemento de enriquecimiento (GS) en el equipo ESP Culture System II que da seguimiento al crecimiento bacteriano e indica cuando el cultivo es positivo.

A los cultivos positivos se les realizó la identificación mediante el método de PCR, empleando dos iniciadores que detectan la región IS6110 del genoma bacteriano presente en bacilos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* y se les realizó el antibiograma a las tres drogas de primera línea en el tratamiento antituberculoso (rifampicina, isoniacida y etambutol), de acuerdo con las recomendaciones de la NCCLS para pruebas de susceptibilidad en *Mycobacterium*.¹² Para el antibiograma se utilizaron cuatro botellas del medio de cultivo Middlebrook 7H9 y se le agregó el suplemento de crecimiento GS, el suplemento de antibióticos PVNA y 0.5 mL del cultivo diluido 1:10. Se agregó 0.5 mL de cada antibiótico en tres de las botellas de cultivo (a una de las botellas no se le agregó

antibiótico, sirviendo como control de crecimiento); las botellas se colocaron en el equipo ESP Culture System II (la cepa se considera susceptible al antifímico de prueba cuando no muestra crecimiento en los tres días posteriores a la positividad del control y se considera resistente cuando muestra crecimiento).

Resultados

De 369 muestras enviadas para cultivo se aislaron 44 cepas de *Mycobacterium* (11.9%), determinando la positividad de los cultivos en un promedio de 21 días. Mediante el método de PCR se determinó que sólo 82% de los aislamientos correspondieron al complejo *M. tuberculosis* y el restante 18% correspondieron a cepas diferentes de *M. tuberculosis* o complejo MOTT. Cuarenta y tres por ciento de los aislamientos fueron susceptibles a los tres antifímicos evaluados, pero otro 43% mostró resistencia a dos o a las tres drogas (multidrogorresistencia).

Discusión

El cultivo tradicional en el medio de Lowenstein-Jensen demora ocho semanas para el desarrollo inicial del microorganismo; sin embargo, los métodos actuales para el cultivo de *Mycobacterium* muestran mayor sensibilidad para su recuperación en menor tiempo. En numerosos trabajos se enfatiza la utilidad de estos nuevos métodos en la rutina del laboratorio que realiza diagnóstico de tuberculosis.¹³⁻¹⁵

Para el presente trabajo, se utilizó el sistema ESP Culture System II que emplea medio Middlebrook 7H9 en botellas conectadas al equipo ESP, donde se realiza el seguimiento del crecimiento bacteriano cada 24 minutos (mediante el consumo de O₂ y producción de CO₂), trazando una curva de crecimiento (para que se detecte una muestra como positiva deben existir aproximadamente 10⁶ UFC/mL de *Mycobacterium*). La figura 1 muestra la positividad de los cultivos en el tiem-

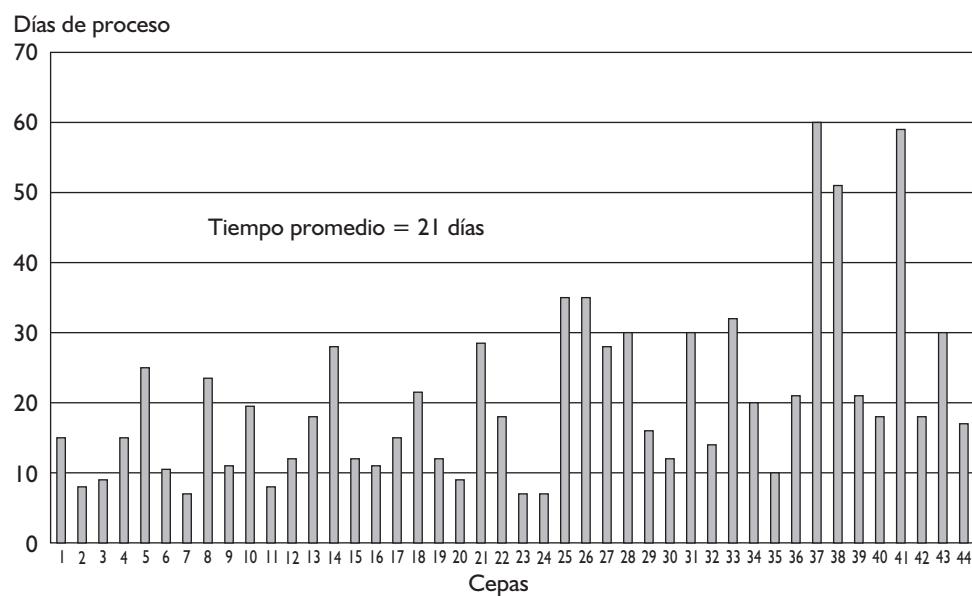


Figura 1. Tiempo de proceso.

73

po; la detección de la positividad del primoaislamiento se realizó en un tiempo promedio de 21 días, lo cual representa una ventaja con respecto al método tradicional.

La utilización de la prueba de PCR en la identificación de los aislamientos de *Mycobacterium* obtenidos por cultivo ha sido ampliamente estudiada para diferenciar al complejo *M. tuberculosis* de otras micobacterias (MOTT).^{16,17} En nuestro estudio observamos que 82% de las cepas correspondieron al complejo *M. tuberculosis* y 18% de los aislamientos no correspondieron al mismo (figura 2); por tanto, se trató de micobacterias que no

causan tuberculosis. Esto refleja la importancia de la caracterización de los aislamientos para evitar falsos diagnósticos de tuberculosis.

La OMS reconoce que ha aumentado el porcentaje de cepas que no responden al tratamiento con drogas de primera línea (isoniacida, rifampicina y etambutol).^{8,9} Como puede apreciarse en la figura 3, 43% de las cepas aisladas fueron suscep-

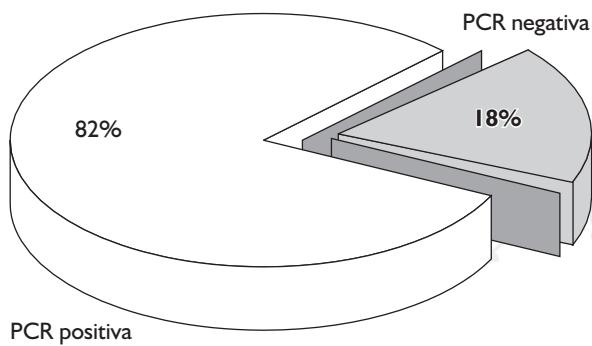


Figura 2. Positividad de la prueba de PCR.

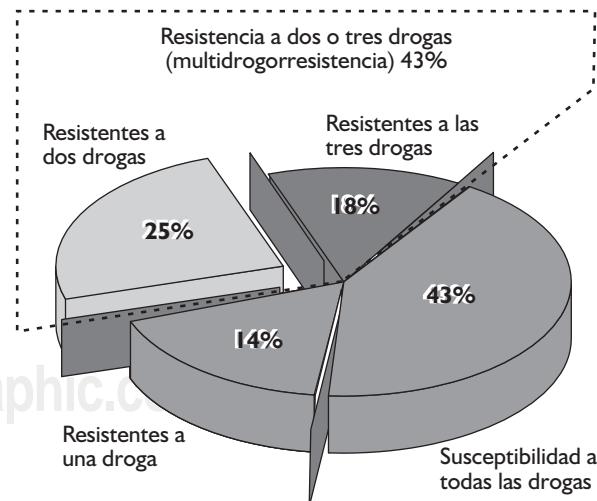


Figura 3. Comportamiento de la susceptibilidad y resistencia a las tres drogas antifimicas evaluadas.

tibles a las tres drogas; pero 57% mostraron resistencia al menos a una droga (14% a una sola droga, 25% a dos drogas y 18% a las tres drogas), 43% de los aislamientos mostraron ser multidrogorresistentes (resistente a dos o más drogas de primera línea).

Conclusiones

El cultivo en un equipo automatizado permite la recuperación más rápida del microorganismo, lo que representa una ventaja sobre el método tradicional. Se deben caracterizar las cepas aisladas en cultivo para evitar falsos diagnósticos de tuberculosis. Debido a la alta incidencia actual de resistencia a las drogas antifímicas de primera línea, cobra vital importancia realizar el antibiograma a todas las cepas de *M. tuberculosis* aisladas para poder instaurar un tratamiento efectivo.

Referencias

74

1. Metchock B, Nolte FS, Wallace RJ Jr. *Mycobacterium*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaffer MA, Tenover FC, Yolken RH editors. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington, DC: ASM Press. 1999: 399-437.
2. Montoro E. Micobacterias. En: Llop-Valdés Dapena-Zuazo. *Microbiología y parasitología médicas*. Ciudad de La Habana: Edit Ciencias Médicas 2001: 636-385.
3. Koneman E. Micobacterias. En: *Diagnóstico microbiológico*. 5a ed. Madrid, España: Edit Médica Panamericana. 2001: 867-926.
4. Casal M. Tuberculosis: enfermedad reemergente. *Invest Cienc* 1998; 265: 33-34.
5. World Health Organization. *Fact Sheet No. 104*. Revised August 2002.
6. OPS. OMS. Situación de salud en las Américas. *Bol Epidemiol* 2000; 21 (4).
7. Secretaría de Salud. *Programa Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis. Manual de Procedimientos*. México: 1999: 1-10.
8. World Health Organization. *Anti-tuberculous drug resistance in the world. Report No. 2. Prevalence and trends. The WHO/IUATLD Global project on anti-tuberculous drug resistance surveillance*. Geneva: World Health Organization, 2000.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Essential Components of a Tuberculosis Prevention and Control Program. Recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1995; 44 (RR-11): 1-6.
10. OPS. *Manual de normas y procedimientos técnicos para la bacteriología de la tuberculosis, Parte I. La Muestra. El Examen Microscópico*. OPS Nota Técnica Núm. 26/Rev. I. 1988.
11. OPS. *Manual de normas y procedimientos técnicos para la bacteriología de la tuberculosis, Parte I. El Cultivo*. OPS Nota Técnica Núm. 27/Rev. I. 1988a.
12. NCCLS. *Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes: tentative standard*. 2nd ed. M24-T2. Vol. 20 (26).
13. Somoskóvi C, Ködmön A, Lantos Z, Bartfai L, Tamási J, Füzy PM. 2000. Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated BACTEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system and Löwenstein-Jensen medium. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2395-2397.
14. Alcaide F, Benítez MA, Escriba JM, Martín R. Evaluation Bactec MGIT 960 and MB/Bact Systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 398-400.
15. Williams-Bouyer N, Yorke R, Lee HI, Woods G. Comparison of BACTEC MGIT and ESP Culture System II for growth and detection of Mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (11): 4167-4170.
16. Noordhoek GT, van Embden JDA, Kolk AHJ. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol* 1996; (34): 2522-2525.
17. Telenti A, Marchesi F, Balz M et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; (31): 175-178.

