

Hemocultivos convencionales para *Mycobacterium spp.* en enfermos con sida

Dr. Carlos Ma. Rivas¹, Tec. Mirna Corbo², Tec. Virginia Dafond²

Resumen

*El diagnóstico de las mycobacteriosis diseminadas en enfermos con sida se realiza eficazmente mediante la realización de hemocultivos. Los mismos no se realizan en laboratorios clínicos por su alto costo y complejidad. Desarrollamos y evaluamos un sistema de hemocultivos convencionales de bajo costo y fácil ejecución para el aislamiento de mycobacterias en sangre. Las muestras de sangre recogidas con polianetol sulfonato de sodio como anticoagulante se inocularon en frascos de medio 7H9+OADC. Se realizaron repiques en medio de Lowenstein Jensen inmediatamente a la inoculación y a los 14 y 28 días posteriores. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos con el sistema Isolator 10, con porcentajes de positividad de 9,5% en muestras y de 12,5% en enfermos. La demora promedio para el informe de positivos fue de 30 días. El aislamiento más frecuente fue *Mycobacterium avium complex*.*

Palabras clave: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida – complicaciones
Micobacteriosis – diagnóstico
Micobacteriosis – sangre

Introducción

El incremento de las mycobacteriosis en enfermos con sida en Uruguay ha hecho necesaria la solicitud de hemocultivos para mycobacterias ya que se conoce la frecuencia del *Mycobacterium avium complex* (MAC) como agente de infección diseminada en estos enfermos⁽¹⁻⁵⁾. El hemocultivo cuali o cuantitativo es una técnica poco invasiva y de buen rendimiento diagnóstico en estos casos^(5,6). En nuestro país no han sido posible implementar, por su costo y complejidad, los sistemas comerciales de cultivo de sangre para mycobacterias (Isolator 10, Bactec TB 460, MB Bact). El objetivo de esta comunicación es presentar los resultados obtenidos durante un año en he-

emocultivos para *Mycobacterium spp.* utilizando un método convencional de bajo costo y fácil realización producido en nuestro laboratorio.

Método

Población

En el período setiembre 1997–1998 se recibieron en el laboratorio un total de 187 muestras de sangre correspondientes a 80 enfermos con sida y sospecha clínica de infección diseminada procedentes del servicio de infecto contagiosos del Ministerio de Salud Pública.

Muestras

Se recomendó en lo posible la extracción de tres muestras de sangre (5 a 10 ml) obtenidas en días consecutivos. La sangre fue colectada en tubos conteniendo polianetol sulfonato de sodio (SPS) como anticoagulante (Vacutainer, BBL, Cokeysville, Maryland, Estados Unidos), y se remitió de inmediato para su procesamiento.

1. Jefe del Dpto. de Bacteriología de la Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (CHLA-EP). Centro Nacional de Referencia para Mycobacterias.

2. Técnicos del Dpto. de Bacteriología de la CHLA-EP.

Correspondencia: Dr. Carlos Ma. Rivas. Jefe del Departamento de Laboratorio CHLA-EP, Centro Nacional de Referencia para Mycobacterias. Avda. 18 de Julio 2175. CP 11200. Montevideo, Uruguay
Presentado 6/5/99

Aceptado 26/6/99

Tabla 1. Hemocultivos para *Mycobacterium spp.* en enfermos con sida

Resultado de hemocultivos	Muestras		Pacientes	
	Nº	%	Nº	%
Positivos	17	9,1	10	12,5
Negativos	166	88,8	68	85,0
Contaminados	4	2,1	2	2,5
Total	187	100	80	100

Medio para hemocultivos

Los frascos de medio (30 ml) se prepararon en el laboratorio utilizando una base de 7H9 suplementado con OADC (Difco Lab. Estados Unidos) al 10 %. Cada frasco fue inoculado con 5 ml de sangre.

Incubación y lecturas

Inmediatamente después de la inoculación en 7H9+OADC se sembraron dos tubos de Lowenstein Jensen (LJ) para establecer recuento de bacterias en sangre. Posteriormente se estudiaron los frascos a los 7, 14 y 28 días de incubación; la lectura a la semana se efectuó para detectar flora bacteriana inespecífica en cuyo caso se procedió al tratamiento de decontaminación y resiembra de la muestra. Teniendo en cuenta que nuestro propósito fue detectar desarrollo del género *Mycobacterium*, todo desarrollo bacteriano que no correspondiera a este género se consideró como contaminación del procedimiento. Los hemocultivos y sus repiques se incubaron a 37°C durante 90 días.

Identificación bacteriana

Se utilizaron los métodos de identificación estándar para mycobacterias basados en velocidad de desarrollo, temperatura de crecimiento, producción o no de pigmento con fotodependencia y las pruebas bioquímicas necesarias para la identificación. El diagnóstico de mycobacterias del complejo *avium* fue confirmado por biología molecular (sondas genéticas) en el Laboratorio de Referencia para Mycobacterias de la Organización Mundial de la Salud en Winnipeg, Canadá (Dr. Adalbert Laszlo).

Informes

Los frascos negativos se informaron en forma primaria a los 28 días (luego de realizarse microscopía para mycobacterias (BAAR); posteriormente se efectuó un segundo y último informe definitivo a los 90 días cuando los hemocultivos y sus repiques en LJ permanecieron negativos. En caso de tinción positiva para BAAR en los frascos (días 14 y 28) se informó de inmediato como "positivo

para BAAR"; de igual forma se procedió ante el desarrollo en los repiques de LJ, los cuales se controlaron cada 14 días.

Resultados

Se procesaron un total de 187 muestras correspondientes a 80 enfermos con sida (tabla 1). Resultaron positivas 17 muestras (9,1%) que correspondieron a diez enfermos (12,5%). El agente hallado en casi todos los casos fue *Myc. avium complex*; destacamos un caso de aislamiento de *Myc. Bovis/BCG* el cual correspondió a un lactante VIH positivo vacunado con BCG. La contaminación ocurrió en cuatro muestras (2,1%) correspondientes a dos enfermos (2,5%). Para las muestras positivas la demora en el informe fue entre cuatro y cinco semanas posteriores al inóculo del hemocultivo. La microscopía por fluorescencia del hemocultivo, sin centrifugación, fue negativa siempre, a los 14 días de incubación, pasando a positiva a los 28 días. Los repiques ciegos a medio sólido (LJ) fueron positivos a los 14 días para los frascos que llevaban 14 días de incubación. Es decir que, fuere por la microscopía directa del hemocultivo o por los repiques ciegos, el diagnóstico positivo de mycobacterias se obtuvo en la mayoría de los casos a las cuatro semanas. Solamente respondientes a sendos pacientes se obtuvo un cultivo positivo al momento del inóculo, estableciéndose el número de unidades formadoras de colonias (ufc) por ml de sangre. Los recuentos fueron de 30 y 60 ufc/ml respectivamente. El promedio de muestras por paciente fue de 2,3 con un rango entre uno y cinco muestras (tabla 2). El mayor porcentaje de enfermos se estudió con tres muestras (34/80) y dos muestras (29/80); el rendimiento diagnóstico obtenido en términos de proporción de positivos según muestras enviadas fue de 1/14 ($p=0,07$) para una muestra, 3/29 ($p=0,10$) para dos muestras y de 6/34 ($p=0,18$) para tres muestras por paciente. De los diez enfermos con hemocultivos positivos (tabla 3), en cinco casos existían estudios bacteriológicos positivos para mycobacterias obtenidos en forma concomitante; muestras de expectoración, LCR, biopsias de ganglios y lesión posvacunal (BCG) respectivamente. En el resto de los en-

Tabla 2. Número de muestras enviadas por paciente y resultados positivos.

Muestras enviadas por paciente	Total pacientes (N)	Pacientes positivos	Muestras positivas de la serie *
1	14	1	1/1
2	29	3	1/2 2/2 2/2
3	34	6	3/3 3/3 2/3 1/3 1/3 1/3
4	2	0	-
5	1	0	-
Total	80	10	

* Muestras positivas / Total de muestras de la serie

Tabla 3. Resultados de hemocultivos positivos en 10 pacientes.

Paciente N°	N° de muestras enviadas	N° de muestras positivas	Demora del informe en días	Otras muestras positivas	Mycobacterias aisladas
1	1	1	35	Biopsia de ganglio	<i>M. avium complex</i>
10	1	1	35	No	MNT *
9	1	1	45	No	MNT*
6	2	1	35	Expect.(3) Biopsia de ganglio	<i>M. tuberculosis</i>
5	2	2	30	Biopsia de ganglio	<i>M. avium complex</i>
8	2	2	35	Expect.(3) L.C.R.	<i>M. avium complex</i>
4	3	1	40	No	<i>M. avium complex</i>
3	3	2	40	No	<i>M. avium complex</i>
7	3	3	30	Lesión zona vacunal / BCG	<i>M. bovis/BCG</i>
2	3	3	35	No	<i>M. avium complex</i>

* MNT = Mycobacterias no *M. tuberculosis*, sin identificación definitiva.

fermos los hemocultivos fueron el único o el primer estudio positivo para establecer una mycobacteriosis diseminada.

Discusión

La necesidad de confirmación bacteriológica de las mycobacteriosis diseminadas en enfermos con sida determinó la implementación de hemocultivos con una técnica similar a la utilizada por Wong y colaboradores⁽³⁾, la cual había mostrado buenos resultados. Si bien posteriormente surgen nuevos sistemas comerciales los mismos no han podido, por su costo y complejidad, ser instrumentados en Uruguay hasta el momento. Un método conocido como Isolator 10 fue utilizado por Truffot-Perrot y colaboradores⁽⁶⁾ donde obtienen rendimientos similares a los nuestros (10,8% de positivos en muestras y 11,5% de positivos en enfermos). Asimismo nuestros re-

sultados coinciden en la utilidad de la toma de tres muestras seriadas en días consecutivos. La intensidad de la bacteriemia, al parecer muy variable según Wong y col.⁽³⁾ donde encuentran entre 350 y 28.000 ufc por ml, ha mostrado en nuestro estudio resultados constantemente bajos, menores a 60 ufc en todos los positivos. En cuanto a la demora de los informes, es igual a la que se produce cuando se estudian muestras de otro tipo usando los sistemas de cultivo convencionales. Hasta tanto no se disponga de sistemas de cultivo rápidos, la información diagnóstica que obtenemos es de gran utilidad. Los hemocultivos realizados hasta el momento nos permiten afirmar que la frecuencia de las mycobacteriosis diseminadas y de las especies o complejos aislados en el sida, parece ser, para Uruguay, muy similar a otros países, con un neto predominio del complejo *avium* tal como ha sido descrito.

Summary

Diagnosis of disseminated mycobacteriosis in patients with AIDS can be determined by blood cultures. Because of its costs and complex procedures, clinical laboratories do not deal with this group cultures. A conventional blood culture system was set up in order to isolate in a simple, low-cost way mycobacteriosis from blood. Blood samples with anticoagulant sodium polyanethole sulfonate were used to inoculate 7H9+OADC. Subcultures on Lowenstein Jensen were done immediately after inoculation, and at days 14 and 28. Obtained data were similar to those obtained using Isolator IU, with 9.5% positive among samples and 12.5% positive among patients. Reports of positive results lasted 30 days average. Isolation more frequent was *Mycobacterium avium* complex.

Résumé

Le diagnostic des mycobactérioses disséminées chez des malades de Sida s'effectue efficacement au moyen d'hémocultures. Ils ne se réalisent pas dans des laboratoires cliniques vu son coût élevé et sa complexité. On a développé et évalué un système d'hémocultures conventionnel pas cher et à exécution facile pour l'isolement de mycobactéries en sang. Les échantillons de sang obtenus avec polyanéthol sulfonate de sodium en tant qu'anticoagulant, ont été inoculés dans des flacons de milieu 7H9+OADC. On a fait des actions au milieu de Lowenstein Jensen immédiatement après l'inoculation, et après 14 et 28 jours postérieurs. Les résultats obtenus sont similaires à ceux

obtenus avec le système Isolator 10, avec des pourcentages de positivité de 9.5% aux échantillons et de 12.5% chez les malades. Le délai moyen pour le rapport de positifs a été de 30 jours. L'isolement le plus fréquent a été *Mycobacterium avium* complex.

Bibliografía

1. **Wolinsky E.** Non tuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Respir Dis* 1979; 119:107-59.
2. **Zakowski P, Fligel S, Berlin OG, Jhonson Jr BL.** Disseminated *Mycobacterium avium*-intracellulare infection in homosexual men dying of acquired immunodeficiency. *JAMA* 1982; 248:2980.
3. **Wong B, Edwards FF, Kiehn TE, Whimbey E, Donnelly H, Bernard H, et al.** Continuous high grade mycobacterium avium-intracellulare bacteremia in patients with the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Med* 1985; 78:35-40.
4. **Young LS, Iderlied CB, Berlin OG, Gottlieb MS.** Mycobacterial infections in AIDS patients, with an emphasis on the *Mycobacterium avium* complex. *Rev Infect Dis* 1986; 8:1024-33.
5. **Kiehn TE, Camarata R.** Laboratory diagnosis of mycobacterial infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1986; 7:52-4.
6. **Truffot-Pernot C, Lecoeur HF, Maury L, Dautzenberg B, Grosset J.** Results of blood cultures for detection of mycobacteria in AIDS patients. *Tubercle* 1989; 70:187-91.