

Diagnóstico de la infección micobacteriana diseminada: evaluación de un método sencillo y barato para países en desarrollo¹

F. C. O. Fandinho,² B. Grinsztejn,³ V. G. Veloso,³ M. C. S. Lourenço,³

E. Werneck-Barroso,³ E. João,⁴ S. A. Nogueira² y L. de S. Fonseca⁵

RESUMEN

Con el desarrollo de la epidemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), el aislamiento de micobacterias de la sangre se ha convertido en un problema habitual de los laboratorios clínicos. En el presente estudio se evaluaron dos métodos para aislar micobacterias en muestras de sangre de pacientes de sida: 1) la inoculación directa en un medio bifásico y 2) un método no comercializado de lisis por centrifugación. A cada uno de los 50 pacientes de sida con sospecha de enfermedad micobacteriana diseminada se le extrajeron tres muestras de sangre consecutivas a intervalos de 15 minutos. En 70 de 138 muestras de sangre obtenidas de 30 (60%) pacientes se detectó crecimiento de micobacterias. A partir de estos cultivos, en 19 pacientes se aisló *Mycobacterium tuberculosis* y en 11 (37%), el complejo *Mycobacterium avium*. Los cultivos en que se utilizó el método de lisis por centrifugación fueron positivos en 54% de los pacientes, mientras que esta cifra se redujo a 44% en los cultivos en que se usó el método bifásico ($P > 0,05$). El porcentaje de muestras positivas al complejo *M. avium* fue mayor con el método de centrifugación por lisis (91%) que con el de inoculación directa en medio bifásico (45,4%) ($P < 0,05$). Sin embargo, los porcentajes de muestras positivas a *M. tuberculosis* detectadas con el método de lisis por centrifugación (89,5%) y con el de inoculación directa en un medio bifásico (100%) fueron similares ($P > 0,05$). La técnica no comercializada de centrifugación por lisis es barata, fiable y puede constituir un método alternativo para el diagnóstico de micobacteriemia en países en desarrollo.

¹ Se publica en el *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 75, No. 4, 1997, con el título "Diagnosis of disseminated mycobacterial infection: testing a simple and inexpensive method for use in developing countries". © Organización Mundial de la Salud, 1997.

² Universidad Federal de Rio de Janeiro, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

³ Hospital Evandro Chagas, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

⁴ Hospital Servidores do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

⁵ Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil. Las solicitudes de separatas han de enviarse a este autor a la siguiente dirección postal: Departamento de Microbiología Médica, Instituto de Microbiología, Universidad Federal de Rio de Janeiro, Centro para las Ciencias de la Salud, Bloco 1, Ilha do Fundão, 21.941-590, Rio de Janeiro, Brasil.

Tras el desarrollo de la epidemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), el aumento progresivo de infecciones micobacterianas diseminadas secundarias ha galvanizado la búsqueda de un método sensible para aislar micobacterias en la sangre. El rendimiento diagnóstico más elevado para los organismos del complejo *Mycobacterium avium* se alcanza con los métodos de cultivo de lisis por centrifugación (1, 2). Estas técnicas están comercializadas y se utilizan habitualmente en los Estados Unidos de

América y en Europa occidental (3, 4). El diagnóstico con el medio de cultivo radiométrico BACTEC es más rápido y su sensibilidad es similar, pero requiere sustrato radioactivo y no permite obtener colonias aisladas (5, 6). Ambos métodos son demasiado caros para utilizarlos habitualmente en países en desarrollo. En el presente estudio prospectivo se compara la eficiencia de dos métodos distintos empleados para detectar el crecimiento de micobacterias en la sangre periférica de pacientes de sida: 1) la inocula-

ción directa en un medio bifásico y 2) un método barato no comercializado de centrifugación por lisis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Entre diciembre de 1993 y agosto de 1994, se obtuvieron muestras de sangre de 50 pacientes de sida con sospecha de enfermedad micobacteriana diseminada. El principal criterio utilizado para seleccionar a los pacientes fue la fiebre de origen desconocido y uno de los síntomas siguientes: hepatoesplenomegalia, infiltrado pulmonar, anemia o elevación de la fosfatasa alcalina. Cuando fue posible, se realizaron recuentos (células/ μ L) de linfocitos T CD4.

Personal debidamente capacitado extrajo en total tres muestras de sangre a cada paciente dejando un lapso de 15 minutos entre las extracciones. Cada muestra se obtuvo en dos tubos Vacutainer (Becton Dickinson, MD, EUA) que contenían ácido etilendiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. En cada extracción se tomó la temperatura de los pacientes. En total, se obtuvieron 138 muestras de sangre de los pacientes estudiados. De acuerdo con las indicaciones clínicas, se obtuvieron otros tipos de muestras (por ej., esputo) para cultivo habitual de micobacterias.

A su llegada al laboratorio, el contenido de un tubo Vacutainer se mezcló con 30 mL de una solución al 0,3% de deoxicolato de sodio y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de centrifugarlo durante 25 minutos a 3 000 g (y a 4 °C), el grumo se suspendió en 1 mL de una solución salina de albúmina bovina al 0,2% (Fraction V, Sigma, St. Louis, MO, EUA), de la cual se añadieron 0,2 mL a un tubo que contenía caldo Middlebrook 7H9 y a dos medios de cultivo en agar Löwenstein-Jensen.

El contenido del segundo Vacutainer se añadió directamente a un medio bifásico que contenía 5 mL de caldo Middlebrook 7H9 y 15 mL de agar Middlebrook 7H10. Todos los aislamientos de micobacterias se identificaron por medio de métodos bioquímicos.

Para comparar proporciones entre grupos de pacientes, se empleó la

prueba de ji al cuadrado (χ^2) (con la corrección de Yates en tablas 2×2). Para comparar variables continuas, se utilizó la prueba de la *t* de Student. En ambos casos se realizaron pruebas bilaterales a un nivel de significación igual a 0,05.

RESULTADOS

Se detectó crecimiento de micobacterias en 70 de las 138 muestras de sangre pertenecientes a 30 de los 50 (60%) pacientes incluidos en el estudio. En 19 (63%) pacientes los cultivos fueron positivos a *M. tuberculosis* y en 11 (37%), a micobacterias del complejo *M. avium*. Solo en cuatro pacientes en cuyas muestras de sangre se habían aislado micobacterias del complejo *M. avium* se aislaron también micobacterias en otras muestras biológicas. En uno de ellos se aislaron micobacterias del complejo *M. avium* en una muestra de hígado (paciente no. 3). En dos se aislaron *M. tuberculosis* en cultivos de esputo (paciente no. 46) o en una biopsia de nódulo linfático (paciente no. 1). En uno se aislaron *M. gordonae* en las heces (paciente no. 13). En la mayor parte de los pacientes con hemocultivos positivos a *M. tuberculosis* se aislaron las mismas especies de micobacterias en otras muestras clínicas. No obstante, la tuberculosis se diagnosticó en cinco pacientes solo después de disponer de los resultados de los hemocultivos (pacientes nos. 6, 7, 18, 19 y 32). Estos resultados, incluidos el recuento de linfocitos T CD4, se representan en el cuadro 1.

En los pacientes cuyos hemocultivos fueron positivos al complejo *M. avium* la media del recuento de linfocitos T CD4 fue de 15,9 células por μ L, mientras que en aquellos cuyos hemocultivos fueron positivos a *M. tuberculosis* la media fue de 71,1 células/ μ L (recorrido de valores: 0 – 449 células/ μ L).

En total, 19 (63%) pacientes con cultivos positivos a micobacterias también dieron resultados positivos con los dos métodos utilizados. En 54% (27/50) los hemocultivos fueron positivos con el método de lisis por centrifugación, mientras que con la técnica

del medio bifásico los hemocultivos fueron positivos en 44% (22/50). La diferencia entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa ($P > 0,05$). Las medias del tiempo de detección de ambos métodos fueron, respectivamente, 42,8 y 58,2 días. Esto significa, probablemente, que con el método de lisis por centrifugación se recuperaron más micobacterias viables de la sangre que con el método bifásico, a pesar de que la diferencia entre ambas técnicas no fue estadísticamente significativa. Al comparar los resultados obtenidos con los medios de cultivo en agar Löwenstein-Jensen y con el caldo Middlebrook 7H9 utilizados para aislar micobacterias en el método de lisis por centrifugación, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$; resultados no mostrados) para *M. tuberculosis* (34% y 42%, respectivamente) ni para el complejo *M. avium* (45% y 36%, respectivamente). Sin embargo, se encontró una diferencia muy marcada cuando se compararon los dos métodos de hemocultivo según las especies de micobacterias aisladas (cuadro 2). El porcentaje de hemocultivos positivos al complejo *M. avium* fue más alto con el método de lisis por centrifugación (10/11 = 91%) que con el método bifásico (5/11 = 45,4%) ($P < 0,05$), si bien para *M. tuberculosis* el porcentaje de hemocultivos positivos detectados por ambos métodos fue similar (89,5% y 100%, respectivamente; $P > 0,05$) (figura 1). Los resultados obtenidos en muestras del mismo paciente fueron concordantes en 39 de 50 (78%) pacientes.

DISCUSIÓN

A pesar de que se dispone de técnicas que facilitan la detección de micobacterias en la sangre (2, 7), pocos estudios se han centrado en la bacteriemia por *M. tuberculosis* en pacientes de sida (6, 8, 9). El presente estudio sugiere que la bacteriemia causada por este microorganismo es frecuente en estos pacientes en el Brasil y algunos investigadores han apuntado que su frecuencia ha aumentado (5). Esta in-

CUADRO 1. Resultados del cultivo de micobacterias en 50 pacientes de sida

Paciente No.	Recuento de linfocitos T CD4	Hemocultivo			Cultivo de otras muestras biológicas	
		Medio bifásico	Método de lisis por centrifugación	Especies de micobacterias identificadas	Lugar de obtención de las muestras	Especies de micobacterias identificadas
1	0	+	+	Complejo <i>M. avium</i>	Nódulo linfático	<i>M. tuberculosis</i>
2	52	+	+	Complejo <i>M. avium</i>	—	—
3	12	+	+	Complejo <i>M. avium</i>	Hígado	Complejo <i>M. avium</i>
4	40	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	—LBA ^a	<i>M. tuberculosis</i>
5	100	—	—	—	—	—
6	46	No realizado	+	<i>M. tuberculosis</i>	—	—
7	86	No realizado	+	<i>M. tuberculosis</i>	—	—
8	50	—	+	Complejo <i>M. avium</i>	—	—
9	0	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	Espudo	<i>M. tuberculosis</i>
10	0	—	+	Complejo <i>M. avium</i>	—	—
11	20	—	+	Complejo <i>M. avium</i>	—	—
12	0	—	—	—	—	—
13	19	—	+	Complejo <i>M. avium</i>	Heces	<i>M. gordonae</i>
14	31	—	—	—	—	—
15	165	—	—	—	Espudo	<i>M. tuberculosis</i>
16	89	—	—	—	—	—
17	49	—	—	—	—	—
18	0	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	—	—
19	50	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	—	—
20	32	—	—	—	Espudo	<i>M. tuberculosis</i>
21	38	—	—	—	—	—
22	34	—	—	—	—	—
23	80	—	—	—	—	—
24	265	—	—	—	—	—
25	48	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	Médula ósea	<i>M. tuberculosis</i>
25				—	Espudo	<i>M. tuberculosis</i>
25					Heces	<i>M. tuberculosis</i>
26	151	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	Médula ósea	<i>M. tuberculosis</i>
27	15	—	—	—	—	—
28	59	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	Nódulo linfático	<i>M. tuberculosis</i>
29	33	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	Médula	<i>M. tuberculosis</i>
30	135	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	Espudo	<i>M. tuberculosis</i>
30					Médula	<i>M. tuberculosis</i>
30					Nódulo linfático	<i>M. tuberculosis</i>
31	53	—	—	—	—	—
32	20	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	—	—
33	25	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	Hígado	<i>M. tuberculosis</i>
33					Espudo	<i>M. tuberculosis</i>
34	75	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	Nódulo linfático	<i>M. tuberculosis</i>
35	0	+	—	<i>M. tuberculosis</i>	Espudo	<i>M. tuberculosis</i>
36	449	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	Espudo	<i>M. tuberculosis</i>
37	5	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	Espudo	<i>M. tuberculosis</i>
38	13	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	Espudo	<i>M. tuberculosis</i>
39	116	+	—	<i>M. tuberculosis</i>	Médula	<i>M. tuberculosis</i>
40	0	—	—	—	Espudo	<i>M. tuberculosis</i>
41	0	—	—	—	—	—
42	15	+	—	Complejo <i>M. avium</i>	—	—
43	100	—	—	—	Espudo	<i>M. tuberculosis</i>
44	2	—	—	—	Espudo	<i>M. tuberculosis</i>
45	0	—	—	—	Espudo	<i>M. tuberculosis</i>
46	5	—	+	Complejo <i>M. avium</i>	Espudo	<i>M. tuberculosis</i>
47	2	+	+	Complejo <i>M. avium</i>	—	—
48	0	—	+	Complejo <i>M. avium</i>	—	—
49	2	—	—	—	LBA	<i>M. tuberculosis</i>
50	5	—	—	—	Nódulo linfático	<i>M. tuberculosis</i>

^aLBA = lavado broncoalveolar.

CUADRO 2. Comparación de diversos medios de cultivo para el aislamiento de micobacterias de la sangre en los pacientes de sida estudiados

	<i>M. tuberculosis</i>			Complejo <i>M. avium</i>		
	LC-7H9 ¹	LC-LJ ²	Medio bifásico	LC-7H9 ¹	LC-LJ ²	Medio bifásico
Positivo	16	13	17	8	10	5
Negativo	3	6	0	3	1	6
No realizado	0	0	2	0	0	0

¹ Sangre procesada mediante lisis por centrifugación y añadida al caldo Middlebrook 7H9.

² Sangre procesada mediante lisis por centrifugación y añadida al cultivo en agar Löwenstein-Jensen.

investigación también sugiere que el hemocultivo es un método diagnóstico útil ante la sospecha de tuberculosis, incluso cuando en otras muestras biológicas no es posible aislar esta micobacteria. Por consiguiente, estos datos concuerdan con los de Bouza et al. (10), aunque se contraponen con los de Shafer et al. (6), para los cuales esta técnica no fue útil para diagnosticar la tuberculosis.

El complejo *M. avium* es el causante de la infección bacteriana más frecuente en pacientes de sida en los Estados Unidos y Europa (3, 8), si bien prácticamente se desconoce su frecuencia en los países en desarrollo (11). Los resultados de la presente in-

vestigación y los de Barreto et al. (12) sugieren que la infección causada por el complejo *M. avium* puede ser más frecuente en los pacientes de sida del Brasil de lo que se ha notificado.

El mayor rendimiento diagnóstico del método de lisis por centrifugación para *M. avium* estriba en que estos microorganismos no se encuentran habitualmente libres en el plasma (1). Al producirse la lisis de leucocitos de la sangre periférica se liberan micobacterias intracelulares que se concentran posteriormente con la centrifugación, lo cual aumenta la sensibilidad del hemocultivo (4). Como *M. tuberculosis* es una bacteria patógena verdadera con mayor capacidad para causar enfermedad diseminada, ambos métodos fueron sensibles para detectar bacteriemia por *M. tuberculosis*. Aunque se considera que el caldo de Middlebrook 7H9 es más sensible que las pruebas realizadas en medios sólidos, como los cultivos en agar Löwenstein-Jensen, el no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas puede deberse al pequeño tamaño de la muestra utilizada.

Los bajos recuentos de linfocitos T CD4 de los pacientes con hemocultivos positivos al complejo *M. avium* (15,9 células/ μ L) concuerdan con los hallazgos de algunos investigadores que estimaron que el riesgo de desarrollar bacteriemia por *M. avium* es mucho más elevado cuando dicho recuento es menor de 50 células/ μ L (13-15). No obstante, la media de dicho recuento (71,1 células/ μ L) calculada en los pacientes de cuya sangre se aisló *M. tuberculosis* fue menor que la mayor parte de las medias notificadas en otros estudios (recorrido de

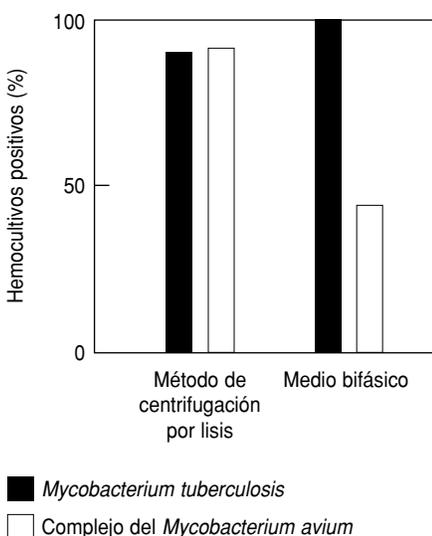
valores: 23-742 células/ μ L) en el momento de establecerse el diagnóstico de la tuberculosis. En los pacientes portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con tuberculosis extrapulmonar los recuentos de linfocitos T CD4 (media = 153 células/ μ L) son menores que los de los pacientes que solo padecen tuberculosis pulmonar (16, 17). Este dato está respaldado por el alto porcentaje de pacientes con tuberculosis diseminada (78%) encontrado en este estudio y por el hecho de que en todos los pacientes la prueba cutánea de la tuberculina fue negativa.

Los resultados de las tres muestras de sangre consecutivas de un mismo individuo fueron concordantes en 39 pacientes (78%), lo cual sugiere que una sola muestra de sangre es suficiente para diagnosticar la micobacteriemia. En un estudio retrospectivo realizado para evaluar la utilidad de pares de hemocultivos se obtuvieron resultados similares: 96% de los resultados de pares de hemocultivos fueron concordantes (18). Ninguno de los pacientes del presente estudio tuvo fiebre en el momento en que se le extrajeron las muestras de sangre, situación que no coincide con los criterios aplicables a la extracción de muestras para diagnosticar bacteriemia causada por microorganismos que no son ácido-alcohol resistentes.

En conclusión, este estudio muestra que el hemocultivo puede realizarse empleando un método no comercializado, sensible y barato para diagnosticar la enfermedad micobacteriana diseminada, y se recomienda utilizarlo habitualmente en los laboratorios de los países en desarrollo en que se diagnostiquen estas infecciones. Además, este estudio demuestra que la frecuencia de la infección diseminada causada por el complejo *M. avium* en los pacientes de sida del Brasil es elevada.

Agradecimiento. Este estudio recibió el apoyo de CNPq y de FINEP, Brasil. Los autores agradecen a M.G. Silva y a O.M. Santos el respaldo técnico prestado y a A. Silva su ayuda con el resumen.

FIGURA 1. Comparación de los porcentajes de hemocultivos positivos detectados con los dos métodos de cultivo estudiados, según las especies aisladas



REFERENCIAS

1. Meylan PR, Richman DD, Kormbluth RS. Characterization and growth in human macrophages of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from the blood of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Infect Immun* 1990;58:2564-2568.
2. Salfinger M, Stool EW, Piot D, Heifets L. Comparison of three methods for recovery of *Mycobacterium avium* complex from blood specimens. *J Clin Microbiol* 1988;26:1225-1226.
3. Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LE. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:266-310.
4. Pitchenik AE, Fertel D. Tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial diseases. *Med Clin North Am* 1992;76:121-171.
5. Baber TW, Craven DE, McCabe WR. Bacteremia due to *Mycobacterium tuberculosis* in patients with human immunodeficiency virus infection. *Medicine* 1990;69:375-383.
6. Shafer RW, Goldberg R, Sierra M, Glatt AE. Frequency of *Mycobacterium tuberculosis* bacteremia in patients with tuberculosis in an area endemic for AIDS. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:1611-1613.
7. Kiehn TE, Gold JW, Brannon P, Timberger RJ, Armstrong D. *Mycobacterium tuberculosis* bacteremia detected by the isolator lysis-centrifugation blood culture system. *J Clin Microbiol* 1985;21:647-648.
8. Saltzman BA, Motyl MR, Friedland GH, McKittrick JC, Klein RS. *Mycobacterium tuberculosis* bacteremia in the acquired immunodeficiency syndrome. *JAMA* 1986;256:390-391.
9. Truffot-Pernot C, Lecoeur HF, Maury L, Dautzenberg B, Grosset J. Results of blood cultures for detection of mycobacteria in AIDS patients. *Tubercle* 1989;70:187-191.
10. Bouza E, et al. High prevalence of tuberculosis in AIDS patients in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:785-788.
11. Gilks CF, Brindle RJ, Mwachari C, Batchelor B, Bwayo J, Kimari J, et al. Disseminated *Mycobacterium avium* infection among HIV-infected patients in Kenya. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995;8:195-198.
12. Barreto JA, Palaci M, Ferrazoli L, Martins MC, Suleiman J, Lorencó R, et al. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from bone marrow aspirates of AIDS patients in Brazil. *J Infect Dis* 1993;168:777-779.
13. Crowe SM, Carlin JB, Stewart KI, Lucas CR, Hoy JF. Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infection and malignancies in HIV infected persons. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991;4:770-776.
14. Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, Jockusch JD, Cal SX, Wynne BA. Incidence of *Mycobacterium avium* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Infect Dis* 1992;165:1082-1085.
15. Horsburg Jr CR. Current concepts: *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1991;324:1332-1338.
16. Theuer CP, Hopewell PC, Elias D, Schecter GF, Rutherford GW, Chaisson RE. Human immunodeficiency virus infection in tuberculosis patients. *J Infect Dis* 1990;162:8-12.
17. Jones BE, Young SMM, Barnes PF. Relationship of the manifestations of tuberculosis to the CD4 counts in patients with human immunodeficiency virus infection. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1292-1297.
18. Stone BL, Cohn DL, Kane MS, Hildred MV, Wilson ML, Reves RR. Utility of paired blood culture and smears in diagnosis of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1994;32:841-842.

ABSTRACT

Diagnosis of disseminated mycobacterial infection: testing a simple and inexpensive method for use in developing countries

With the development of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) epidemic, the isolation of mycobacteria from blood has become a common problem for clinical laboratories. In this study two methods were used for the recovery of mycobacteria from blood specimens obtained from AIDS patients: (1) direct inoculation in biphasic medium, and (2) a noncommercial lysis-centrifugation method. A total of three consecutive blood samples were taken at 15-minute intervals from each of 50 AIDS patients with clinical suspicion of disseminated mycobacterial disease. Mycobacterium growth was noted in 70/138 blood specimens from 30 (60%) patients. These cultures yielded *Mycobacterium tuberculosis* in 19 (63%) and *Mycobacterium avium* complex organisms in 11 (37%) patients. Cultures using the lysis-centrifugation method were positive in 54% of the patients, while cultures using biphasic medium were positive in 44% ($P > 0,05$). The positivity for *M. avium* complex was higher with lysis-centrifugation (91%) than with biphasic medium (45,4%) ($P < 0,05$). However, the positivities for *M. tuberculosis* with the lysis-centrifugation method (89,5%) and direct inoculation in biphasic medium (100%) were similar ($P > 0,05$). The use of a noncommercial lysis-centrifugation technique is inexpensive, reliable, and can be an alternative method for the diagnosis of mycobacteremia in developing countries.
