

LA DETERMINACION DE LA ESTREPTOMICINO-
RESISTENCIA DEL *MYCOBACTERIUM TUBER-
CULOSIS* CON LA TECNICA DE PRYCE

Por H. BONFIGLIOLI, A. CETRANGOLO y C. ACUÑA

Desde el descubrimiento de la Estreptomicina y su aplicación al tratamiento de la tuberculosis, observaron los fisiólogos que algunos enfermos no mejoraban con el uso del antibiótico.

Investigaciones posteriores demostraron que, de algunos de esos pacientes, se aislaban *Mycobacterium tuberculosis* que presentaban "in vitro", una resistencia más o menos marcada a la Estreptomicina.

De esas observaciones surgió la conveniencia de investigar, antes de iniciar y durante el tratamiento, la resistencia de los bacilos al antibiótico, para evitar gastos y pérdidas de tiempo inútiles.

Varios han sido los métodos propuestos para efectuar esas determinaciones: cultivos en diferentes medios sólidos y líquidos, con agregado de cantidades variables de Estreptomicina, y con aislamiento previo de los bacilos en los medios comunes.

Más tarde se usaron diversos procedimientos, por los cuales se determinaba la estreptomicino-resistencia partiendo del cultivo directo del esputo.

El único inconveniente de estos métodos es que los resultados son algo tardíos: pues el desarrollo bacteriano en los tubos testigos no se observa antes de los 25-30 días.

Uno de nosotros (1), ensayó el medio de Herrold y observó que los resultados obtenidos coincidían generalmente con los datos suministrados por la clínica.

Con el fin de obtener resultados más rápidos, decidimos ensayar una nueva técnica.

En 1945, DUBOS (2), propuso un medio de cultivo líquido para la obtención de desarrollo homogéneo del My-

Presentado para publicar el 6 de junio de 1950.

cobacterium tuberculosis y que se presentaba rápidamente, en ocasiones en 4 ó 5 días.

Modificado posteriormente por el mismo autor, está constituido por un medio sintético, al cual se le agrega albúmina de bovino y un ester hidrosoluble del ácido oleico, conocido en el comercio con el nombre de Tween 80.

Por otra parte, PRYCE (3), en 1941, describió un método de cultivo del *Mycobacterium tuberculosis*, que consistía en la obtención de microcolonias directamente en un portaobjeto sumergido en medio líquido.

MÜLLER (4), en 1944, modificó el medio de cultivo, usando el procedimiento de Pryce para la determinación del poder bacteriostático de diversos agentes químicos sobre el bacilo de Koch.

ILAN (5), en 1946, ensayó el método para determinar la penicilino-resistencia del *Mycobacterium tuberculosis*, usando como medio de cultivo la solución madre de Löwenstein.

El primero que usó la técnica de Pryce con el medio de Dubos, parece haber sido Jensen, quien nos comunicó personalmente sus observaciones, que fueron posteriormente publicadas. (6).

En 1949, diversos autores comunicaron sus experiencias, usando la misma técnica y diferentes medios de cultivo. (7-8-9-10).

Antes de llegar a nuestro conocimiento esas observaciones, habíamos iniciado un estudio comparativo, usando el medio de Herrold y la técnica de Pryce con medio de Dubos.

TECNICAS USADAS

Medio líquido para el procedimiento de Pryce.

Usamos el medio propuesto por Davis - Middlebrook (11), en 1947, con ligeras modificaciones.

Medio base: KH_2PO_4 1 g.
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot (2\text{H}_2\text{O})$ 3,15 „
 Asparagina 1 „

Disolver en 100 ml. de agua tridestilada, calentando

hasta disolución completa y luego completar hasta 800 ml. con agua tridestilada.

Agregar luego:

Casamino acids Difco * (hidrolizado ácido de caseína)	1,5 g. (disuelto previamente en 30 ml. de H ₂ O).
Phytone (digestión enzimática (**)) de soja, semillas de algodón y maní).	1,5 g. (disuelto previamente en 30 ml. de H ₂ O).
CaCl ₂	0,0005 g. (1 ml. al 0,05 %).
ZnSO ₄	0,0001 g. (1 ml. al 0,01 %)
CuSO ₄	0,0001 g. (1 ml. al 0,01 %)
Citrato hierro amoniacal	0,005 g. (1 ml. al 0,5 %).
MgSO ₄ ,7 H ₂ O	0'01 g. (1 ml. al 1 %).

A 900 ml. de este medio base, se le agregan 5 ml. de solución acuosa al 10 % de Tween 80. Se esteriliza 15 minutos a 115°C. y una vez enfriado se agregan 100 ml. de solución acuosa de albúmina de bovino, fracción V *** al 5 %, neutralizada previamente con OHNa, calentada a 56°C. durante 30 minutos a baño de maría y filtrada por bujía Chamberland L3.

Repartimos el medio en 4 frascos de Erlenmeyer agregando a tres de ellos cantidades suficientes de Estreptomicina para obtener una concentración de 10, 50 y 100 microgramos por ml., respectivamente. El 4º frasco, sin antibiótico, sirvió para los controles.

Repartimos asépticamente los medios en tubos de ensayo de vidrio Pyrex, a razón de 5 ml. cada uno y usamos para nuestras experiencias 2 tubos de cada concentración y 2 de testigo por cada muestra examinada.

Las modificaciones que efectuamos al medio original consistieron en el reemplazo del hidrolizado enzimático de caseína propuesto por Davis-Middlebrook, por igual cantidad de Casamino Acids Difeo (Hidrolizado ácido de caseína), debido a la imposibilidad de conseguir el producto original. Agregamos además, 1,5 g. por mil de Phytone, pues por experiencias previas efectuadas, observamos un desarrollo más precoz y abundante con agregado de ese producto, que sin él.

(*) CASAMINO ACIDS DIFCO, es un hidrolizado de caseína obtenido por vía ácida.

(**) PHYTONE es una digestión enzimática de soja, semillas de algodón y maní, preparado por Baltimore Biological Laboratory.

(***) Suministrada por Armour y Cía.

Pudimos comprobar también la necesidad de calentar previamente la solución de albúmina, con lo cual, según Dubos, se destruirían enzimas que actuarían sobre el Tween 80, liberando ácido oleico, que tiene efecto tóxico sobre el *Mycobacterium tuberculosis*.

Por último, hemos comprobado la conveniencia de filtrar la albúmina por filtros de porcelana, pues la filtración por Berkefeld o Seitz, según algunos autores, permite el paso de sustancias que inhiben el desarrollo.

No agregamos glucosa, como aconsejan Dubos y Middlebrook, porque favorece la contaminación del medio, por lo menos usando la técnica de Pryce.

El medio de Herrold usado por nosotros está constituido por agar nutritivo, al cual se le agrega, una vez esterilizado y enfriado a 55°C., una yema de huevo obtenida estérilmente, por cada 100 ml. de medio, y 0,8 ml. por ciento de sol. de verde de malaquita acuosa al 1 %. Se mezcla y se transvasa asépticamente en tubos de ensayo, inclinándolos rápidamente en pico de clarinete, para su coagulación.

Los esputos examinados se agitaron en un frasco con perlas de vidrio estéril para homogeneizarlos. Con un ansa se efectuaron frotis en un extremo de un portaobjetos común cortado longitudinalmente para permitir su introducción en los tubos con el medio de cultivo.

Se prepararon 9 frotis con cada material, procurando colocar siempre la misma cantidad, extendida en la misma superficie. Se dejaban secar en la estufa y uno de ellos, se coloreó con el método de Ziehl-Neelsen, para observar la disposición de los bacilos en el esputo, pues la presencia de gérmenes agrupados hubiera podido dificultar la lectura de los resultados.

Los 8 frotis restantes, sin fijar, se colocaron en un cilindro Borrel conteniendo sol. acuosa de ácido sulfúrico al 5 %, esterilizada, durante 6 minutos; se lavaban luego dos veces con agua destilada estéril en frascos apropiados y se colocaron luego en los tubos con medio de Dubos: preparamos dos tubos controles y dos con cada concentración de Estreptomícina. Los frotis los dejamos sumergidos completamente en el medio.

A los 8 días de incubación a 37°C., se extraían los portas y previa fijación por el calor, se colorearon con el método de Ziehl-Neelsen.

La observación con pequeño aumento, objetivo 20X y ocular 8X, permitió observar, en los casos positivos, la presencia de microcolonias características de *Mycobacterium tuberculosis*. (fig. 1 y 2).

Consideramos como límite de resistencia a la Estreptomomicina, el tubo con mayor cantidad de antibiótico que permitía aún observar el desarrollo de una colonia típica.

La observación con pequeño aumento permite el examen de todo el frotis en pocos minutos.

Otra parte del material fué tratada con sol. acuosa de ácido sulfúrico al 6 % durante 15 minutos y previa neutralización con sol. acuosa de OHNa al 20 %, se sembró en medio de Herrold con y sin estreptomomicina.

La lectura se efectuó cuando aparecían colonias en los tubos controles y la interpretación de los resultados se hizo como en la experiencia anterior. En ningún caso obtuvimos desarrollo antes de 20 días.

EXPERIENCIAS REALIZADAS

Efectuamos el estudio comparativo con 30 esputos de enfermos internados en la Cátedra de Patología y Clínica de la Tuberculosis.

En todos los casos, menos uno, en los frotis controles, los bacilos se presentaron aislados. Elegimos expresamente esputos muy bacilíferos, pues según algunos autores, la técnica de Pryce no da buenos resultados con materiales paucibacilares.

RESULTADOS OBTENIDOS. — De los 30 casos examinados, en 2 de ellos no fué posible efectuar la lectura, por contaminación de los tubos con medio de Dubos y en otro, los cultivos con ambos métodos y el frotis dieron resultado negativo.

De los 27 casos restantes, en 18, o sea 66,66 %, hubo concordancia con los dos procedimientos. En 3 (Nº 2, 21 y 27), o sea 11,11 %, los bacilos se mostraron más resistentes con la técnica de Pryce, mientras que en 6 casos (Nº 1, 3, 12, 14, 22 y 26), o sea 22,22 %, la resistencia

fué mayor con el medio de Herrold.

C U A D R O

Caso	Pryce-Dubos	Herrold	Caso	Pryce-Dubos	Herrold
1	10	100	16	10	10
2	100	10	17	T	T
3	50	100	18	negativo	negativo
4	infectado	—	19	T	T
5	10	10	20	100	100
6	100	100	21	10	T
7	10	10	22	50	100
8	T	T	23	100	100
9	T	T	24	T	T
10	infectado	—	25	100	100
11	10	10	26	50	100
12	T	100	27	10	T
13	10	10	28	100	100
14	10	100	29	100	100
15	100	100	30	50	50

Los números indican la mayor concentración en microgramos de estreptomycinina por ml. de medio, que permitió el desarrollo de por lo menos una colonia típica. La "T", indica desarrollo en el tubo testigo solamente.

Hemos preferido tomar como límite de resistencia la presencia de una sola colonia, aunque algunos autores opinan que es preferible considerar la mayor cantidad de Estreptomycinina que presente un desarrollo semejante al testigo. Opinamos que nuestra interpretación es más exacta desde el punto de vista comparativo.

CONSIDERACIONES GENERALES

Sin pretender afirmar la superioridad de un procedimiento sobre el otro, pues para ello sería necesario la observación de un mayor número de casos y su comparación con los datos clínicos, creemos que la técnica de Pryce con medio de Dubos puede ser de utilidad para la determinación de la Estreptomycinina-resistencia, especialmente por la rapidez de los resultados obtenidos, factor de gran importancia en clínica.

El agregado de los productos de hidrólisis ácida de caseína en reemplazo de los obtenidos por digestión enzimática de la misma, no impide el desarrollo del *Mycobacterium tuberculosis*: ignoramos si lo mejora o no.

El agregado de Phytone (posiblemente por su riqueza en amino-ácidos), favorece notablemente el desarrollo de los bacilos.

La mayor cantidad de cepas estreptomycin-resistentes determinadas con el medio de Herrold, parece confirmar la observación de Fisher (13-14), de que el medio de Dubos, por la presencia del Tween 80, aumenta la acción bacteriostática de la estreptomycin.

En todos los cultivos efectuados con la técnica de Pryce, con resultados positivo, observamos, además de microcolonias típicas, la presencia de bacilos aislados, y en todos los casos de cepas muy resistentes, notamos la aparición de menor cantidad de microcolonias, a medida que aumentaba la concentración de Estreptomycin.

Estas características, difíciles de observar con los métodos comunes de determinación de la Estreptomycin-resistencia, hablarían en favor de la hipótesis sostenida por Jensen y otros autores, de que en un mismo enfermo se pueden encontrar *Mycobacterium tuberculosis* de resistencia variable al antibiótico.

Los casos de infección observados con la técnica de Pryce, creemos que hubieran podido evitarse, de haber efectuado las observaciones con material más adecuado, especialmente para el lavado de los porta-objetos.

CONCLUSIONES

La determinación comparativa de la resistencia a la estreptomycin en 30 casos, con la técnica de Pryce, utilizando el medio de Dubos-Middlebrook modificado por nosotros y con el medio de Herrold, ha dado resultado concordante en 18 (66,66 %).

En 3 casos (11,11 %), observamos mayor resistencia con la técnica de Pryce y en 6 (22,22 %), un aumento de la misma con el medio de Herrold.

Creemos que la técnica usada por nosotros puede ser de utilidad para la determinación e interpretación de la resistencia a la estreptomycin y otros antibióticos, del *Mycobacterium tuberculosis*.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) CETRANGOLO, A. — *La Prensa Méd. Arg.* 1949, 36, 1662.
- 2) DUBOS, R. J. — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1945, 58, 351.
- 3) PRYCE, D. M. — *J. Path. Bact.* 1941, 53, 327.
- 4) M LLER, H. — *J. Path. Bact.* 1944, 56, 429.
- 5) ILAN, C. N. — *J. Path. Bact.* 1946, 58, 495.

- 6) JENSEN, K. A. — *Acta Tuberc. Scand.* 1949, suppl. 21, 42.
- 7) BERRY, J. L. W. y LOURY, H. — *Amer. Rev. Tuberc.* 1949, 60, 51.
- 8) BERNARD, E. y KREIS, L. — *Rev. de la Tuberc.* 1949, 13 (1-2), 124.
- 9) GERNEZ RIEUX C. L., SEVIN, A. y CHEFFET. — *Rev. de la Tuberc.*, 1949, 13, 326.
- 10) CUMMINS, M. M., DRUMMOND, M. C. y SCHWARTZ, H. B. — *Dis. of the Chest* 1950, 17, 202.
- 11) DUZOS, R. J. y MIDDLEBROOK, G. — *Amer. Rev. Tuberc.* 1947, 56, 334.
- 12) HERROLD, R. D. — *Y. Infec. Dis.* 1931, 48, 236.
- 13) FISHER, M. M. — *Amer. Rev. Tuberc.* 1948, 57, 53.
- 14) FISHER, M. M. — *Amer. Rev. Tuberc.* 1948, 57, 58.

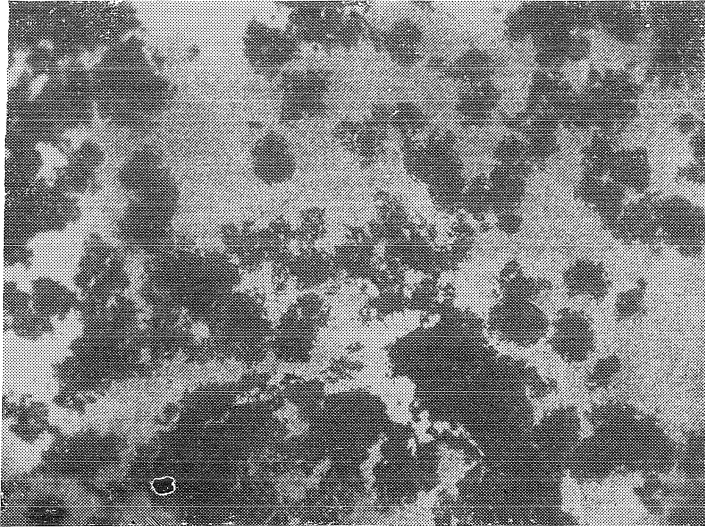


Fig. 1 — Microcolonias de *Mycobacterium tuberculosis*.



Fig. 2 — Microcolonias de *Mycobacterium tuberculosis*.