DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DEL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* A LA ESTREPTOMICINA

Por **ABEL CETRANGOLO**

A medida que el empleo de la estreptomicina en el tratamiento de la tuberculosis se va generalizando, se han planteado una serie de problemas, algunos de los cuales están relacionados con el laboratorio.

Uno de los principales es el que se refiere a la forma cómo actúa la droga en presencia de los bacilos de Koch aislados de los enfermos.

En lo referente a los gérmenes obtenidos de aquellos pacientes que aun no han sido sometidos a la estreptomicinoterapia, los investigadores aceptan que en su gran mayoría son sensibles a la droga en cantidad que en general es menor de 1 mcgm. por cc. de medio. Sin embargo Pyle (1) demostró que no todos los bacilos, provenientes de un mismo material, de enfermos que aun no habían recibido droga, tienen la misma sensibilidad. En 7 de los 8 casos que estudió, encontró que algunos de los gérmenes estaban dotados de una relativa resistencia, pues pudo obtener un número pequeño de colonias en presencia de 5 a 10 mcgms. de estreptomicina, en marcado contraste con el abundante cultivo que se obtenía del mismo material en el medio que no tenía estreptomicina. Además nunca observó la presencia de colonia en los medios que contenían 25 ó más mcgms. de droga por cc. de medio.

Youmans, Williston, Feldman e Hinshaw (2), fueron los primeros que hicieron notar que el bacilo tuberculoso es capaz de desarrollar resistencia a la estreptomicina cuando se mantiene en contacto con la droga, ya sea "in vitro" o "in vivo".

La importancia de este hecho es fundamental, pues se lo considera estrechamente relacionado con la eficacia que

Presentado para publicar el 3 de mayo de 1949.

puede tener este tratamiento, y así vemos que los autores en general consideran la aparición de la estreptomicino-resistencia como un factor que anula la eficacia terapéutica de la droga.

Referente a cuándo debemos considerar a una cepa como resistente, en general se acepta clasificarla como tal, cuando es capaz de desarrollar "in vitro" en presencia de 10 mcgms. de droga por cc.

El momento durante el curso del tratamiento en el cual aparece la estreptomicino-resistencia varía mucho de un enfermo a otro, hecho este que ha sido observado por todos aquellos que se ocuparon del tema.

Nosotros hemos visto un caso en el que la resistencia apareció después de inyectar sólo 13 gramos de droga, mientras que de otro enfermo que había recibido 300 gramos, aislamos una cepa sensible a la misma.

Uno de los inconvenientes que se presenta en este estudio, sobre todo del punto de vista práctico, es el tiempo prolongado que es necesario para poder dar al clínico, el resultado de los datos obtenidos por el laboratorio.

La técnica que para el dosaje de la estreptomicino-resistencia siguen la mayoría de los autores, consiste en líneas generales en: aislamiento de los bacilos, a partir de los esputos u otros materiales, en un medio sólido a base de huevo. Una vez que se ha obtenido el cultivo, la siembra de estos bacilos en los medios que tienen distintas diluciones de estreptomicina; estos últimos medios pueden ser líquidos como el de Proskauer y Beck, el de Dubos y Davis (3) o el de Youmans (4); o sólidos como el de Herrold (5) al que con este fin usaron Pyle y Karlson y Needham (6).

En este trabajo queremos dar a conocer los resultados que hemos obtenido en el estudio de una serie de esputos de tuberculosos, la mayor parte de los cuales estaba o habían estado en tratamiento con estreptomicina.

La técnica que hemos seguido fué la siguiente: para el aislamiento de los bacilos usamos el medio a base de huevos de Arena (7); al material —esputos— lo colocamos en un frasco con perlas de vidrio esterilizado y lo agitamos. Luego se agrega el doble del volúmen de ácido sulfúrico al 5 % y volvemos a agitar hasta obtener una emulsión homogénea; se agregan unas gotas de tintura

de tornasol, que sirve de indicador, y lo pasamos a un tubo de ensayo; se deja entre 15 y 20 mnutos en la estufa a 37º C. y se neutraliza con hidróxido de sodio al 20 %. De cada material sembramos 5 tubos con medio de cultivo y se lleva a 37º C.

Una vez que se obtiene desarrollo, cosa que sucede entre los 10 y 40 días, colocamos una cantidad del cultivo en un frasquito con perlas de vidrio, se agita y se le añade una cantidad de agua destilada estéril, hasta conseguir una emulsión homogénea aproximadamente a 1 mgr. de bacilos —peso húmedo— por cc.

Sembramos 0,1 cc. de esta emulsión, en cada tubo de los medios de cultivo que contenían las distintas diluciones de estreptomicina.

Los medios que empleamos con este fin fueron el de Youmans líquido y otro sólido, el de Herrold.

Karlson y Needham, que usaron el medio sólido, dicen que tiene la ventaja de su mayor sencillez y que además se ve mejor la diferencia de crecimiento.

Estos autores hicieron un estudio comparativo entre el medio líquido de Proskauer y Bek y el sólido de Herrold; estudiaron 245 cultivos de los cuales 10 no desarrollaron en el medio líquido y lo hicieron bien en el sólido: 1 desarrolló en el líquido y no lo hizo en el sólido. En ningún caso un cultivo sensible a la estreptomicina en un medio fué resistente a la misma, en el otro. En 6 cultivos provenientes de enfermos que no recibieron droga, se observaron colonias aisladas en los tubos de medios sólidos, que contenían de 10 a 50 mcgms. de estreptomicina, mientras que los tubos controles presentaban cultivos abundantes. Tres de estas colonias no desarrollaron en los medios con estreptomicina cuando volvieron a ser testadas en el mismo medio, pero las otras tres mantuvieron su resistencia.

Además dosaron 9 cepas sensibles y 17 resistentes que estuvieron guardadas en la heladera durante 16 meses. Sólo una cepa resistente creció en el medio líquido, mientras que 3 sensibles y 7 resistentes, lo hicieron en el sólido.

Nosotros estudiamos 100 cepas sembrando al mismo tiempo en los medios de Youmans y de Herrold. Las diluciones de estreptomicina fueron de 10, 100 y 1.000 mcgrms. por cc., además de los tubos de control que no llevaban droga.

Todas las cepas desarrollaron tanto en el medio sólido como en el líquido.

Sólo en 4 casos se observó discordancia, en 2 de estos se vió que mientras en los tubos con medio líquido sólo los controles mostraban desarrollo bacilar, en los medios sólidos con 10 mcgms. de droga había un cultivo aunque no llegaba a ser tan abundante como el que se observaba en los tubos controles del mismo medio. En un caso sucedió lo inverso, o sea que en los tubos de medio líquido que contenían 10 mcgrms. de droga se observó desarrollo, mientras que los tubos correspondientes de medio sólido permanecían estériles. En otro caso se observó que mientras en el medio líquido había desarrollo en presencia de 100 mcgrms. en el sólido sólo se observaba en presencia de 10 mcgrms.

La concordancia de los resultados obtenidos en los medios líquidos y sólidos es muy grande. Además se observa generalmente el hecho de que, cuando el cultivo que se obtiene en uno de los medios, sea líquido o sólido, con una cantidad dada de droga, es menor que en el control, en el otro medio se obtiene un resultado semejante.

Queremos hacer notar que nosotros consideramos el grado de resistencia de acuerdo al tubo con mayor cantidad de droga en el cual el desarrollo obtenido es semejante al de los controles. Cuando en un caso vemos que por ejemplo hay desarrollo semejante al control en los tubos que contienen 10 mcgms. de droga y que en los que contienen 100 mcgms. se ven algunas escasas colonias —si es sólido— o un pequeño sedimento y ligera turbidez al agitar si es líquido decimos que es resistente a 10 mcgms.

Consideramos que la eficacia de los medios de cultivo que hemos empleados es semejante, y también, de acuerdo con Karlson y Needham, que la lectura de los resultados es más simple en los medios sólidos. En lo referente a la sencillez de un medio con respecto a otro, creemos que los dos que empleamos son lo bastante sencillos para que puedan hacerse en cualquier laboratorio dedicado al estudio de la tuberculosis.

El inconveniente que encontramos en estas investigaciones se refiere, como lo hicimos notar, al tiempo relativamente prolongado que es necesario para dar un resultado y que en muy pocos casos puede ser menor de 25 días.

Pensamos que tal vez podría subsanarse este inconveniente sembrando el material a estudiar —previo tratamiento con ácido sulfúrico al 5 % y neutralización con soda al 20 %— en el medio de Herrold con las distintas diluciones de estreptomicina, además de los tubos controlles, como lo hizo Pyle aunque éste usaba placas de Petri en vez de tubos.

La principal objeción que hacen Karlson y Needham a este procedimiento, es que debe haber una uniforme distribución de los bacilos tuberculosos en las muestras, de modo que cada tubo sea inoculado con aproximadamente el mismo número de bacterias. Los casos que contienen pocos bacilos, hecho que sucede con frecuencia en los enfermos bajo tratamiento, no permiten el test directo.

Otro inconveniente con que nos encontramos, es la facilidad con que se contaminan los tubos con medio de Herrold, hecho que creemos debido a la falta de un bacteriostático en la composición de este medio, pues vimos que sembrando los mismos esputos, en el medio de Arena, que lleva verde malaquita, sólo se nos infectó el 4 % de los cultivos mientras que en el de Herrold la infección llegabab al 20 %.

Estudiamos en esta forma 60 esputos, que después fueron testados a partir de los cultivos puros de los tubos controles, en los medios de Youmans o de Herrold o en ambos a la vez.

En 46 casos los resultados obtenidos fueron idénticos usando ambos métodos. En 11 se observó diferencias en el grado de la resistencia, pues mientras con un método sólo obteníamos desarrollo en presencia de 10 mcgms. por ejemplo, con el otro se observaba en presencia de 100 mcgms. De estos 11 casos 7 desarrollaron en presencia de cantidades mayores de droga en los casos de cultivo directo, mientras que los 4 restantes lo hicieron a partir de los bacilos aislados previamente. En solo 3 materiales, 1 proveniente de un enfermo que no había estado sometido a la estreptomicinoterapia, observamos que mientras el cultivo directo en el medio de Herrold desarrollaba en presencia de 10 mcgms. del antibiótico al ser vueltos a testar a partir del cultivo puro de los tubos controles, sólo crecieron en los tubos que no tenían droga. En estos tres casos la discordancia tiene importancia, pues se puede con-

siderar como resistentes a cepas que en realidad no lo son.

También queremos hacer notar que el medio de Herrold es menos sensible que el de Arena y así vimos casos en los cuales sólo se observó desarrollo en este último medio. Nunca sucedió lo inverso.

Observamos algunos casos en los cuales sólo se obtuvo un desarrollo constituído por escasas colonias aisladas y sólo en uno de los tubos de la serie que sembrábamos. Estas colonias cuando fueron vueltas a testar daban resultados que muchas veces eran discordantes con los obtenidos en el cultivo original.

Así en dos casos vimos desarrollo únicamente en los tubos controles y sin embargo al dosar estas colonias en los tubos con medio de Youmans y de Herrold obtuvimos desarrollo en presencia de 1.000 mcgrms. de droga, lo que confirma lo dicho por Karlson y Needham respecto a la ineficacia del test directo en los casos de esputos con pocos bacilos.

La ventaja de este método consiste en la mayor rapidez con que podemos obtener los resultados y así hemos visto que en 20 casos (33 %) el resultado se conseguía antes de los 15 días y en los restantes antes del mes. Observando los cultivos se ve que en algunos casos el desarrollo aparece antes en los tubos controles que en los que tienen droga, pero la diferencia en el tiempo de aparición de las colonias es raro que pase de los 5 días.

RESUMEN

Se dosó la sensibilidad a la estreptomicina de los bacilos aislados de 100 esputos provenientes en su mayoría de enfermos sometidos a la estreptomicinoterapia, usando comparativamente el medio líquido de Youmans y el sólido de Herrold obteniendo con ambos resultados semejantes.

Se sembraron 60 esputos en el medio de Herrold con distintas concentraciones de estreptomicina además de los tubos controles. Los resultados obtenidos en la mayoría de los casos concordaron con los que se obtuvieron al dosar los bacilos aislados en los tubos controles de los mismos materiales. Creemos que este procedimiento puede ser eficaz, sobretodo por su mayor rapidez y siempre que se empleen materiales muy bacilíferos.

BIBLIOGRAFÍA

1) PYLE, M. — *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* 1947. 22, 465.
2) YOUMANS, G. P., WILLISTON, E. H., FELDMAN, W. H., HINSHAW, H. C. — *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* 1946, 21, 126.
3) DUBOS, R. J., DAVIS, B. B. — *J. Exper. Med.* 1946, 83, 409.
4) YOUMANS, G. P., KARLSON, A. G. — *Am. Rev. of Tuberc.* 1947. 55, 529.
5) HERROLD, R. D. — *J. Infect. Dis.* 1931. 48, 236.
6) KARLSON, A. G., NEEDHAM, G. M. — *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* 1948. 23, 401.
7) ARENA, A. R., CETRANGOLO, A. — *Anales Cat. Pat. y Clin. Tuberc.* 1945. 7, 136.