

ESTUDIO COMPARATIVO DE METODOS DE HOMOGENIZACION PARA INVESTIGAR MICROORGANISMOS ACIDO-ALCOHOL-RESISTENTES

Hernán Calderón N. *, Ma. Cecilia León Ch.**

Key Words: Sputum homogenization, tuberculos specimens, comparisson of methods.

Resumen

Se estudió 1580 muestras de esputo durante dos años y medio, con 8 métodos diferentes de homogenización y de contaminación, se encontró que el más alto porcentaje de positividad se logró por el método de lauril sulfato de sodio, aunque también se obtuvo un alto grado de contaminación. El método de más bajo rendimiento en este estudio fue el de Petroff original.

La técnica más eficiente para seguridad del operador y para el aislamiento de micobacterias atípicas fue el método del ácido oxálico. El método más económico que también ofrece bastante seguridad para el personal, con un excelente rendimiento de positividad, un buen aislamiento de micobacterias atípicas y un bajísimo porcentaje de contaminación, fue el método modificado de Petroff (Rev. Cost. Cienc. Méd. Jun. 1982, 3(1)25—34).

Introducción

Dado que existen diferentes métodos de homogenización para la investigación de microorganismos ácido-alcohol-resistentes y por tener cada uno de estos características muy especiales en su acción decidimos realizar un estudio comparativo de los mismos, con el propósito de escoger el más económico y más práctico que pudiese ser empleado a nivel nacional. El trabajo se realizó del año 1976 al año 1979 en el Hospital Dr. Blanco Cervantes con un total de 1580 muestras.

Material y métodos

Las muestras que se emplearon para el estudio comparativo, representan una muestra escogida de esputos de pacientes tuberculosos de los que un 47,9 por ciento mostraron cultivos positivos, indicando la presencia de enfermedad activa y un 47,0 por ciento no dieron cultivos positivos, posiblemente por estar bajo tratamiento antifímico. Un 1,9 por ciento mostraron cultivos contaminados y un 0,4 por ciento mostraron cultivos positivos por micobacterias atípicas, tal y como se observa en el Cuadro No. 2.

En este estudio, se emplearon 8 métodos diferentes de homogenización de esputos para la detección de bacilos ácido-alcohol-resistentes. Cada una de las muestras se analizó con los 8 métodos programados, y para ello se escogieron lotes que se trabajaron cada dos días, a fin de poder comparar desde los métodos que emplean poco tiempo, hasta aquellos que en trámite emplean períodos de reposo de 24 horas.

* Laboratorio Clínico, Clínica Dr. Marcial Fallas Días — CCSS, San José.

** Laboratorio Clínico, Hospital Mexico, CCSS, San Jose.

Los métodos se discuten a continuación:

1. Método original de Petroff (6)

Este método ha sido utilizado ampliamente en muchos laboratorios con el inconveniente de que en el proceso de neutralización, muchas muestras se contaminan. En la mayoría de las veces, los cultivos no se pueden leer debido a que se proteolizan con facilidad. Esto dificulta el hallazgo del bacilo en casos de tuberculosis muy localizadas, en que los pacientes no expectoran la suficiente cantidad del microorganismo para ser observado microscópicamente, o en los casos de tuberculosis renal, en los que por lo general, es el cultivo el que define el diagnóstico.

2. Método de Kubica y colaboradores del tampón de fosfatos (3)

Como se observa en el Cuadro 1, la solución A actúa sobre la muestra a temperatura ambiente, disolviendo el material mucoso y celulotísular del esputo, especialmente por la acción del NaOH al 4 por ciento y la N-Acetil-L-Cisteína, (A. H. Robins Co., Norwich-Eaton Pharmaceuticals o Sigma Chemical Co.). La solución B, tampón de fosfatos, actúa como neutralizante y según Saxholm (7), es un excelente medio para el crecimiento inoportuno de microorganismos gramnegativos y hongos. Kubica (3), por su parte, indica que es importante trabajar rápidamente para obviar este fenómeno de la contaminación.

3. Método de Nekal BX (5)

Este método es ventajoso porque la muestra se manipula al mínimo por el operador y la contaminación se reduce en lo que respecta a hongos (como se puede observar en el Cuadro 2, se logra un 45,9 por ciento de cultivos positivos por *Mycobacterium tuberculosis*), su inconveniente es que el proceso emplea muchas horas que atrasan el trámite de muestras, especialmente en aquellas dependencias donde hay una consulta copiosa de esta especialidad. El Nekal BX (di-isobutal-naftalina-sulfonato, distribuido por Tember Werke, Alemania; Merz & Co., Frankfurt, Alemania y Norwich Eaton Pharmaceuticals, USA), es un tensioactivo, usado en preparación de jabones.

4. Método de Aerosol T (5)

Este método emplea dos soluciones; una que actúa homogenizando el esputo y la segunda, neutralizando el homogenizado. En sí, el procedimiento es similar al del Nekal BX, pero empleando únicamente 2 horas. Tiene el inconveniente de permitir contaminación del proceso.

5. Método de Cadeconti (2)

Este método desarrollado en nuestro laboratorio consiste en adicionar 5 ml de solución A, a 5 ml de esputo; mezclar vigorosamente e incubar a 37°C por 30 minutos, luego adicionar 1 ml de la solución B, mezclar y centrifugar a 3000 RPM por 15 minutos. Luego decantar y con el sedimento hacer las siembras y los frotis usando asa calibrada. Las soluciones A y B son las siguientes:

Solución A:	Duodecil-sulfonato-benceno de sodio	5 g
	NaOH en lentejas	4 g
	Na ₃ PO ₄	5 g
	Agua destilada csp	1000 ml
Solución B:	CaCl ₂	1,5 g
	BaCl ₂	0,5 g
	Citrato de sodio	0,8 g
	Acido ortofosfórico QP	0,5 ml
	Agua destilada csp	100 ml

El reactivo base de esta técnica, el duodecil-sulfonato-benceno de sodio, es un detergente (Colgate Palmolive de Costa Rica) y su acción es la de un tensioactivo que a la vez dislacera fibras y mucus; produce desinfección que es favorecida por el hidróxido de sodio. Al resultar la acción final del sedimento, ligeramente ácido, se favorecieron las contaminaciones por hongos y fue con el único método con que se logró aislar *Nocardia* sp. en 7 pacientes, lo que representó un 0,44 por ciento del total de muestras analizadas.

6. Método de Lauril sulfato de sodio (8)

Este método, de acuerdo con la técnica original, no adiciona solución salina ni agua destilada con penicilina al sedimento. Algunos autores como Saxholm (7) y Tison & Audrin (9), recomiendan hacer las siembras con asa calibrada y trabajar en un cubículo especial para evitar las contaminaciones que se producen en el preciso momento de la neutralización.

7. Método de Petroff modificado (1)

En el año 1968, Brian y Baker (1) modificaron el Método de Petroff reduciendo el tiempo de acción del NaOH al 4 por ciento, de 30 a 15 minutos y evitando la incubación a 37°C. Asimismo se eliminó la neutralización con el ácido al 15 por ciento e introdujo un lavado final del sedimento con agua estilada estéril, a la cual se le podía adicionar 100 UI/ml de penicilina procaínica o sódica. Con este método se elimina la acción prolongada del NaOH sobre las micobacterias, con lo que las muestras positivas con bacilos ácido-alcohol-resistentes son más viables y a la vez la solución de penicilina, favorece la eliminación de otros microorganismos. Con ello se consigue una menor contaminación de los cultivos, una mayor positividad de esputos provenientes de pacientes tuberculosos y un mejor aislamiento de micobacterias atípicas.

CUADRO 1
 CUADRO BASICO COMPARATIVO DE LAS DIFERENTES TECNICAS DE HOMOGENIZACION DE MUESTRAS
 PARA EL ESTUDIO DE BACILOS ACIDO-ALCOHOL-RESISTENTES

METODOS	CANTIDAD DE MUESTRA	CANTIDAD DE DECONTA-MINANTE	TIEMPO DE ACCION	INDICADOR	NEUTRALIZACION	CENTRIFUGACION
1. Original de Petroff	4 ml	4 ml NaOH al 4%	30' a 37°C	Solf. alcohol. Fenolftaleína 1%	HCl o H ₂ SO ₄ al 15%	10' a 3000 RPM
2. Kubica	4 ml	4 ml Sol. A. temp. amb.	15' a temp. amb.	No emplea	8 ml Sol. B.	15' a 3000 RPM
3. Nkal BX	3 ml	8 ml Sol. A.	24 horas a temp. amb.	No emplea	1 gota de Sol. B.	No emplea Hay precipitado
4. Aerosol T.	4 ml	10 ml Sol. A.	2 horas a temp. amb.	No emplea	2 gotas de Sol. B.	5' a 3000 RPM
5. Caldeconti	5 ml	5 ml Sol. A.	30' a 37°C	No emplea	1 ml Sol. B.	5' a 3000 RPM
6. Lauril sulfato de sodio	3 ml	5 ml Sol. A.	15' a 37°C	Sol. B. en gotas	Sol. B. en gotas	3' a 3000 RPM
7. Modificado de Petroff	3 ml	3 ml NaOH al 4%	15' agitando	No emplea	No se emplea	10' a 3000 RPM
8. Acido oxálico	La que absorbe un hisopo	Acido oxálico al 5%	3' a temp. amb.	No emplea	Citrato de Na. al 5%. 1' a temp. amb.	No emplea

' = minutos — RPM = revoluciones por minuto

CUADRO 2
 CUADRO DE LOS RESULTADOS DE 1580 MUESTRAS DE ESPUTO PROCESADAS CON 8 METODOS DIFERENTES
 DE HOMOGENIZACION Y DECONTAMINACION

	No.	%	PETROFF ORIGINAL	KUBICA	NEKAL BX	AEROSOL T	CALDE- CONTI	LAURIL SULFATO DE SODIO	PETROFF MODI- FICADO	ACIDO OXALICO
Cultivos positivos por <i>M. tuber-</i> <i>culosis</i>	650	41,10	720	726	711	710	758	724	750	47,40
Cultivos negativos por micobac- terias	852	54,00	800	796	773	807	743	821	773	49,00
Cultivos contaminados por hon- gos	29	1,80	27	20	40	30	28	19	21	1,30
Cultivos contaminados por mi- croorganismos grampositivos y gramnegativos	48	3,00	30	35	53	32	47	11	30	1,90
Cultivos positivos por micobac- terias atípicas	1	0,06	3	3	3	3	4	5	6	0,38

8. Método del ácido oxálico (4)

Este método, introducido en el año 1958, por Nassau (4), favorece la escogencia de la parte más purulenta de la muestra, lo que tiene efecto en un mejor aislamiento. Además, con el mismo hisopo que se inicia el proceso, se finaliza, haciendo las siembras en los medios adecuados y también, después de sembrado, con el mismo hisopo se hacen los frotis para el estudio microscópico. Este método únicamente se recomienda para muestras de esputo, con el que se logra mayor porcentaje de aislamiento.

Resultados

De las 1580 muestras analizadas durante dos años y medio, como puede observarse en el Cuadro 2, el mayor porcentaje de cultivos positivos, se obtuvo con el método de lauril sulfato de sodio, logrando un 47,9 por ciento de positividad por *Mycobacterium tuberculosis*. Luego en orden descendente, con 47,4 por ciento de positividad el método del ácido oxálico, con 45,9 por ciento el método de Nekal BX, 45,8 por ciento el de Petroff modificado, 45,5 por ciento el de Kubica, 45,0 por ciento el método del Aerosol T., con 44,9 por ciento el nuestro y por último, con 41,1 por ciento el de Petroff original (6).

En el mismo Cuadro 2, se puede observar que el más alto porcentaje de contaminación por hongos, se obtuvo con el método del Aerosol T., posiblemente debido a un pH neutro o casi neutro del sedimento, producto de los reactivos usados en esta técnica. El más bajo porcentaje de contaminación fungosa se logró con los métodos de Petroff modificado y Nekal BX. Anotamos que con el método elaborado en nuestro laboratorio, se logró aislar *Nocardia* sp. en 7 casos, que representan un 0,44 por ciento del total de las muestras. En ninguno de los pacientes se logró establecer relación patógena.

La mayor contaminación por microorganismos grampositivos y gramnegativos, se obtuvo con el método del Aerosol T. y la menor, con el de Petroff modificado. Un 0,38 por ciento de aislamiento de microbacterias atípicas, se logró con el método del ácido oxálico, siendo 0,06 por ciento el menor porcentaje de aislamiento con el de Petroff original.

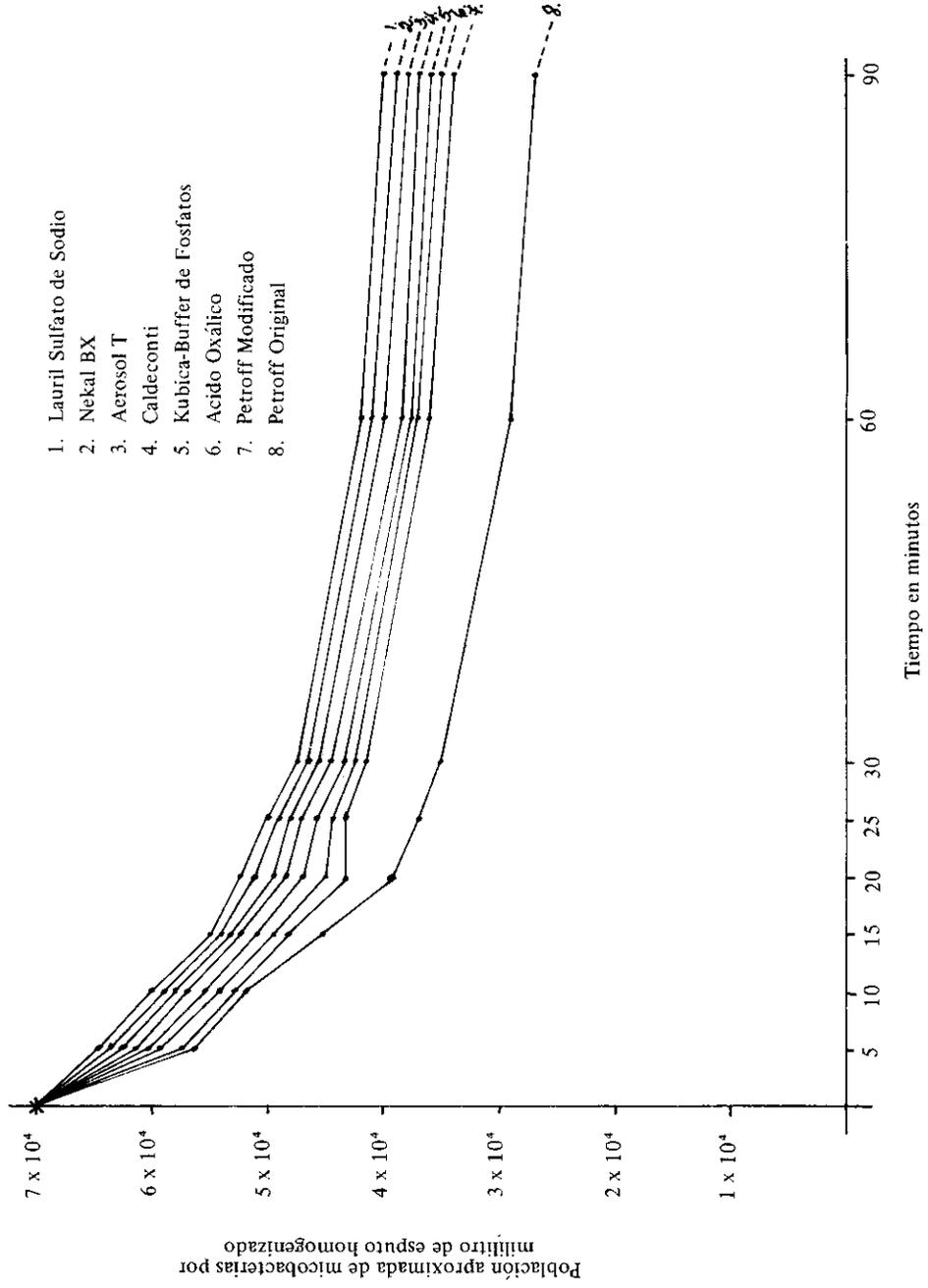
En cuanto al manejo de las técnicas, la de mayor facilidad es la del Nekal BX que aunque ofrece gran seguridad para el operador, para el laboratorio que maneja muchas muestras ofrece el inconveniente de que el tiempo de procesamiento es prolongado. Lo mismo podemos decir de los métodos de lauril sulfato de sodio y Petroff original, los cuales se hacen sumamente tediosos y muchas veces es difícil encontrar el punto final de la neutralización porque la misma muestra modifica el pH.

Los métodos más seguros para la manipulación de muestras de pacientes tuberculosos, fueron el de Nekal BX, el del ácido oxálico y el de Petroff modificado. Se comprueba que de acuerdo con el costo de reactivos, el tiempo de procesamiento, el logro de mayor positividad, facilidad de manipulación y seguridad para el operador, el método de mayor adaptabilidad a nuestras necesidades es el de Petroff modificado.

En el Gráfico 1 se observa la acción del tiempo contra el proceso de homogenización, y de acuerdo con la población aproximada de micobacterias por mililitro de esputo homogenizado, puede verse que después de 15 minutos, el NaOH actúa en forma vigorosa, decreciendo su población significativamente. Esto se logró comprobar mediante recuento de colonias en placas de Medio de Löwenstein—Jensen, con alícuotas de las muestras desde antes del proceso de homogenización, cada 5 minutos hasta 30 minutos y así progresivamente

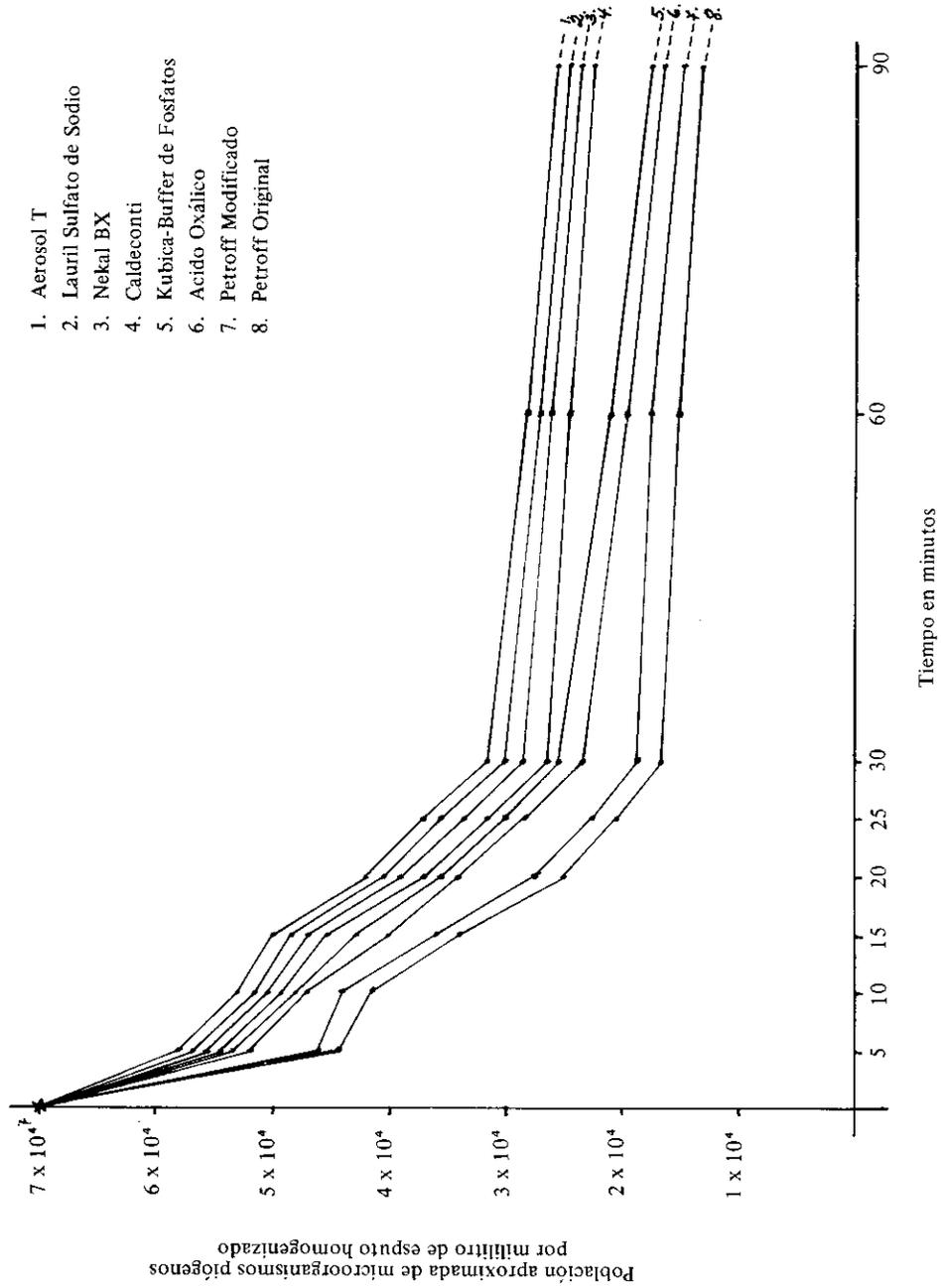
GRAFICA I

CURVAS APROXIMADAS DEL EFECTO DEL TIEMPO CONTRA LAS MICOBACTERIAS EN EL PROCESO DE HOMOGENIZACION



GRAFICA II

CURVAS APROXIMADAS DEL EFECTO DEL TIEMPO CONTRA LOS MICROORGANISMOS
PIOGENOS EN EL PROCESO DE HOMOGENIZACION



hasta 8 horas de acción del decontaminante. Asimismo, en el Gráfico II se señalan los resultados del recuento bacteriano de microorganismos piógenos, efectuado en el medio de tripticasa soya-agar, donde se observa que el método de Petroff, la modificación de Petroff y aún el del ácido oxálico, a los 15 minutos desciende considerablemente la población de microorganismos piógenos. En la modificación de Petroff, esta última característica se favorece con al adición de la solución de penicilina.

Discusión

Como se observa a través del presente trabajo, de acuerdo con las instalaciones y recursos de los laboratorios de las instituciones de salud de nuestro país, y con las experiencias de otros investigadores (1,6), y las nuestras, el método de Petroff modificado ofrece gran seguridad al operador, es de bajo costo y logra excelentes resultados en los aislamientos finales.

Si a la par de esto se pudiera contar en los laboratorios con cubículos adecuados para el procesamiento de estas muestras, se mejoraría mucho la calidad del resultado final y redundaría en beneficio del paciente. Hace algunos años, todas estas muestras se tramitaban en dispensarios u hospitales especializados con laboratorios adaptados a este tipo de labores. Con la implantación de la terapia ambulatoria en tuberculosis y al final, con la integración de los centros especializados al sistema de seguridad social, en los laboratorios de los hospitales generales, se tuvo que improvisar secciones para el trámite de muestras por tuberculosis y por lo general no reúnen las condiciones adecuadas para esta clase de estudio. De ahí que, a través del presente trabajo, nuestra primera recomendación es que debe usarse en técnicas que se adapten a esas limitaciones y que ofrezcan óptimos rendimientos, y segundo, la revisión de todas las técnicas, el método de Petroff modificado es el que mejor se ubica en ese ámbito ya que ofrece mayor seguridad, menor costo y mejor rendimiento para las necesidades nacionales. Pensamos que uniformando todo el país en una sola técnica, los resultados serán más provechosos, y se puede implantar un adecuado control de calidad en los procedimientos.

ABSTRACT

A sample of 1580 sputum specimens was analyzed, during two and a half years, with eight different methods of homogenization and decontamination. It was found that the highest percentage of positive specimens was reached with the method of sodium-lauryl-sulphate however, there was also a high percentage of contamination.

The most efficient technique in regards to safety and isolation of atypical mycobacteria was the oxalic acid technique.

The most economical one, which is safe enough and presents an excellent yield of positive specimens, a good isolation of atypical mycobacteria and has the lowest percentage of contamination was the modification of the original Petroff's technique.

Bibliografía

1. Brian, A. W., Baker, F. J. *Mycobacteria* Butterworths & Co. (Publishers), London, 1968.
2. Calderón, N. H. *Homogenización y Decontaminación de Esputos*. Servicio de Información, Depto. de Inves. Clínica, Hospital Nac. para Tuberculosis, San José, Costa Rica, 1960.
3. Kubica, G. P., Dye, W. P., Cohn, M. L. Middlebrook, G., Sputum Suab Culture. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1963; 87(5):776—779.
4. Nassau, E. Simple Method of Isolation Tubercle Bacilli from Sputum. *Tubercle*, (London). 1958; 39:18—21.
5. Peña, C., Urbancik, R. Pollak, L. Contribución al Problema de la Decontaminación de esputos para el aislamiento de *M. Tuberculosis*. Boletín Informativo del Instituto Nac. de Tuberculosis, Caracas, Venezuela, 1969; 1—17.
6. Petroff, S. A. Isolation of Tubercle Bacilli from Sputum. *Tubercle* (London) 1915; 21:38—42.
7. Saxholm, R. *An Experimental Investigation of Methods for the Cultivation of Mycobacterium tuberculosis from sputum*. Oslo. Univ. Press, Oslo, 1958.
8. Tacquet, A. Tison, F. Nouvelle Technique D'Isolement des Mycobacteries per le Lauryl-Sulfate du Sodium. *Ann. Inst. Pasteur*, 1961; 100:676—680.
9. Tison, F., Audrin, J. *Recherche, Isolement et Etude du Bacille Tuberculeux* Mason Edit. (París), 1956; 44.