

Ovo desidratado para substituir ovo “in natura” na preparação do meio Löwenstein-Jensen para cultivo de micobactérias

Dehydrated egg to replace “in natura” egg in the preparation of Löwenstein-Jensen medium for mycobacteria culture

Heloísa da S.P. PEDRO¹
Maria Izabel F. PEREIRA¹
Maria do Rosário A. GOLONI¹
Elidia Q. GUIMARÃES¹
Maria Alice da S. TELLES²

RIALA6/903

Pedro, H.S.P. *et al.* Ovo desidratado para substituir ovo “in natura” na preparação do meio Löwenstein-Jensen para cultivo de micobactérias. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):125-128, 2001.

RESUMO. Os métodos bacteriológicos são extremamente importantes para diagnosticar tuberculose pulmonar. O meio de cultura mais comumente usado para isolar micobactérias é o Löwenstein-Jensen (LJ), meio sólido à base de ovos. Os ovos precisam sofrer uma limpeza prévia que consiste em escová-los com água e sabão, com posterior descontaminação por 30 minutos em álcool 70%. O ovo “in natura” apresenta dois inconvenientes: esta limpeza, que é demorada e o sistema de compras e armazenamento, pois os ovos devem ser frescos. Com o propósito de simplificar este procedimento, este estudo comparou o meio preparado com ovos frescos e com ovos desidratados. Amostras clínicas foram processadas para cultura e o inóculo foi semeado nos dois tipos de meios. Os resultados das culturas mostraram que das 150 amostras positivas pela baciloscopia, 123 foram positivas no meio convencional e 24 foram negativas, enquanto que no meio teste, foram 121 positivas e 26 negativas, mostrando uma diferença que não foi significativa. Contaminações ocorreram igualmente nos dois meios (3 amostras). Ao comparar-se os dois meios a sensibilidade foi de 98% e a especificidade de 100%. Conclui-se que o ovo desidratado pode ser uma forma alternativa e vantajosa, no preparo do meio de Löwenstein-Jensen.

PALAVRAS-CHAVE. meio de cultura, Löwenstein-Jensen, tuberculose, ovo desidratado.

INTRODUÇÃO

Em 1993 a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a tuberculose uma emergência mundial devido ao fato de ser uma doença em crescimento progressivo em todo mundo e fora de controle nas áreas mais pobres do planeta¹.

O método bacteriológico é o mais importante recurso para o diagnóstico e controle de tratamento da tuberculose, pois permite a detecção do agente etiológico por meio de baciloscopia e cultura.

A baciloscopia é um teste presuntivo, pois possibilita a visualização de bacilos álcool-ácido resistentes quando pre-

¹ Laboratório Regional de São José do Rio Preto – Instituto Adolfo Lutz.

² Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

sententes em quantidades superiores a 10.000 bacilos/mL de amostra, mas não permite sua identificação.

A cultura é um método mais sensível, pois detecta de 10 a 100 bacilos/mL de amostra e possibilita a identificação das espécies e a realização do teste de sensibilidade às drogas antituberculose.

No caso da tuberculose extrapulmonar somente a cultura fornece a confirmação diagnóstica.

Apesar de todo investimento em novos métodos diagnósticos e o avanço alcançado, nestes últimos anos, em metodologias que tragam mais agilidade ao diagnóstico da tuberculose, a cultura continua seguindo como método sem substituto.

As modernas metodologias baseadas em biologia molecular são complexas e de alto custo, inviabilizando sua utilização de forma universalizada^{2,3,4,5,6}.

Uma alternativa é, portanto, o aperfeiçoamento das técnicas já existentes.

O meio de cultura mais utilizado para o isolamento de micobactérias é o Löwenstein-Jensen, que é um meio solidificado à base de ovo e contém glicerol e asparagina como fontes de carbono e nitrogênio. Este meio permite o crescimento da quase totalidade das espécies micobacterianas, tanto ambientais como as de interesse médico⁷.

Com o objetivo de aperfeiçoar e facilitar a técnica de preparo do meio de cultura Löwenstein-Jensen, foi feita uma tentativa de substituir o ovo “in natura” por ovo desidratado utilizado em confeitarias.

O objetivo deste estudo foi comparar os resultados da cultura para diagnóstico de tuberculose, utilizando meio de Löwenstein-Jensen preparado com ovos frescos e com ovos desidratados, através do procedimento tipo secador contínuo com atomização com Spray Driers⁸.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas 150 amostras de escarro e materiais extrapulmonares com baciloscopias positivas e 50 amostras com baciloscopias negativas, recebidos na rotina de cultura do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de São José do Rio Preto/SP, no período de 10 de março a 30 de outubro de 2000. Das 150 amostras com baciloscopia positiva, 147 eram escarro e 3 amostras de origem extrapulmonar; das 50 amostras com baciloscopia negativa, 46 eram escarro e 4 amostras de origem extrapulmonar. O método de descontaminação utilizado foi o de Petroff modificado⁷; de cada amostra, após descontaminação, foi semeado 0,2 mL em 2 tubos de Löwenstein-Jensen (LJ), sendo um convencional e um teste. Os tubos foram incubados a 37 °C, observados e comparados semanalmente, até completar 60 dias de incubação.

Os ovos frescos necessários para a preparação do meio convencional foram adquiridos em supermercados da região; para a utilização dos ovos frescos no preparo do meio de cultura, faz-se necessária uma limpeza prévia dos mesmos

com auxílio de escova, água e sabão, enxagüe em água corrente e imersão em álcool etílico a 70%, durante 30 minutos. O ovo desidratado para a preparação do meio teste foi adquirido em confeitarias da região. O ovo desidratado se apresenta na forma de um pó fino amarelado, e é recomendado o armazenamento em temperatura ambiente por até 180 dias.

Para a obtenção de ovo desidratado que equivalha a 20 ovos grandes necessários na preparação do meio de Löwenstein-Jensen, foi pesado o pó e colocado em copo estéril de liquidificador. Em seguida, batido no liquidificador com a quantidade necessária de água destilada estéril, até completa homogeneização. De acordo com o fabricante, 12,5 g de ovo desidratado equivale aproximadamente a um ovo tipo grande. Portanto para a obtenção de uma solução equivalente a 20 ovos, pesou-se 250 gramas de ovo desidratado em 750 mL de água destilada estéril. Após a homogeneização essa solução de ovos foi filtrada em gaze estéril. Adicionou-se o homogeneizado ao meio base, manipulado segundo a metodologia padronizada⁷. Acrescentou-se uma solução de 2% de verde malaquita que é inibidor de flora contaminante. Distribuiu-se 7 mL deste meio em tubos com tampas rosqueáveis, previamente esterilizados. Coagulou-se a 85 °C por 50 minutos. Os meios de cultura prontos para uso, são estocados em geladeira a 4 °C.

Cada partida do meio de cultura preparado foi avaliada quanto à esterilidade incubando-se a 37 °C por 24 horas, e quanto à sensibilidade no isolamento de micobactérias, de acordo com técnica padronizada pelo Manual de Bacteriologia da Tuberculose⁷. A partir de um cultivo recente (20 a 30 dias de crescimento) de *M. tuberculosis* em meio solidificado, fez-se uma suspensão em 1,0 mL de água destilada estéril, com pérolas de vidro em frasco estéril. Esta suspensão foi transferida para um tubo, acrescentando-se água destilada até obter turvação comparável ao tubo n°1 da Escala McFarland⁹. A partir desta suspensão padronizada, efetuaram-se diluições decimais de até 10⁻⁶. Foi semeado 0,2 mL de cada diluição de *M. tuberculosis* em tubos de Löwenstein-Jensen convencional e em tubos de Löwenstein-Jensen teste¹⁰.

RESULTADOS

Das 50 amostras com baciloscopias negativas, uma deu cultura positiva em ambos os meios. As restantes 49 amostras deram cultura negativa no meio LJ convencional. No meio LJ teste, duas amostras contaminaram e, portanto foram 47 com resultados negativos. Das 150 amostras com baciloscopias positivas, 123 culturas foram positivas no meio LJ convencional e 121 positivas no LJ teste; 24 culturas foram negativas no meio LJ convencional e 26 negativas para o meio LJ teste; 3 culturas mostraram-se contaminadas em ambos os meios, como demonstrado na Tabela 1.

A ocorrência de amostras que tiveram resultados de baciloscopia positiva e culturas negativas (24 no LJ convencional e 26 no LJ teste), deve-se, provavelmente, ao fato de se-

Tabela 1. Resultado da cultura utilizando meio Löwenstein-Jensen e Löwenstein-Jensen teste com ovo desidratado.

Amostras	Meios de cultura					
	L.J. convencional			L.J. teste		
	Pos	Neg	Cont	Pos	Neg	Cont
Baciloscopia Negativa	1	49	0	1	47	2
Baciloscopia Positiva	123	24	3	121	26	3

L.J. – meio de Löwenstein-Jensen

rem amostras provenientes de pacientes em tratamento e cujas baciloscopias apresentavam raros bacilos.

Não houve diferença dos resultados das culturas em relação ao tipo de amostra, pulmonar ou extrapulmonar.

O teste de esterilidade, realizado após 24 horas, não mostrou a presença de contaminação nos meios de cultura convencional e teste.

O controle de qualidade dos meios de cultura, tanto do convencional como do teste, mostraram índice de detecção adequado, pois houve crescimento de 20 colônias ou mais na diluição 10^{-6} em todas as partidas de meio preparadas.

Das culturas positivas 7 tinham aspecto de micobactérias não-tuberculose (MNT); 6 foram identificadas como complexo *Mycobacterium avium* e 1 provavelmente ambiental, pois a identificação não chegou a uma espécie de tipo potencialmente patogênica.

A Tabela 2 mostra os resultados das culturas obtidas em meio LJ convencional e em meio LJ teste.

DISCUSSÃO

A preparação dos meios à base de ovos requer uma limpeza prévia para desinfecção. O uso do ovo desidratado permite a eliminação desta etapa que é bastante trabalhosa. Possibilita ainda, maior flexibilidade na programação de compras e uso do produto, uma vez que o mesmo tem vida útil de 180 dias enquanto o ovo fresco deve ser utilizado em 15 dias. Além disso, permite a estocagem sem necessidade de refrigeração, o ambiente mais limpo e manuseio mais rápido, uniformidade dos produtos, redução de custos e perdas, e a simplificação e diminuição do tempo na preparação do meio.

Tabela 2. Avaliação da acurácia do meio Löwenstein-Jensen teste no isolamento de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de amostras de escarro e de amostras de material extrapulmonar.

Crescimento em L.J. teste	Crescimento em L.J. tradicional		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	122	0	122
Negativo	2	73	75
Total	124	73	197

L.J. – meio de Löwenstein-Jensen

Sensibilidade = $122/124 \times 100 = 98\%$

Especificidade = $73/73 \times 100 = 100\%$

Valor Preditivo Positivo = $122/122 \times 100 = 100\%$

Valor Preditivo Negativo = $73/75 \times 100 = 97\%$

O processo de desidratação não altera as propriedades nutricionais do ovo “in natura”, como proteínas, lipídeos, vitaminas A, D, E, K e do complexo B e sais minerais^{11,12}.

Os resultados das culturas utilizando o meio teste mostraram sensibilidade de 98% e especificidade de 100% (Tabela 2). Os valores de sensibilidade e especificidade de um novo método devem se localizar entre o intervalo de 100 e 95%, para que o método seja considerado aceitável.

As culturas que resultaram positivas, mostraram crescimento de *M. tuberculosis* e outras micobactérias igualmente nos dois meios, indicando que o meio teste tem características semelhantes ao meio convencional, que possibilitam o crescimento das várias espécies de micobactérias.

O cálculo dos valores preditivos positivos e negativos foram de 100% e 97% respectivamente (Tabela 2), indicando que com o meio teste não houve detecção de falsos-positivos, e que ocorreram 2 falsos-negativos. Esses resultados mostram não haver diferenças significativas entre os dois tipos de meios comparados, quanto ao isolamento e crescimento de micobactérias, tanto para amostras de escarro como para materiais extrapulmonares.

O custo do ovo desidratado no comércio é ligeiramente inferior ao do ovo fresco.

Conclui-se que o ovo desidratado é uma alternativa viável que propicia a simplificação na preparação do meio, além de facilitar a programação de compra e armazenamento, com custo equivalente ao do ovo fresco.

RIALA6/903

Pedro, H.S.P. *et al.* Dehydrated egg to replace “in natura” egg in the preparation of Löwenstein-Jensen medium for mycobacteria culture. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2):125-128, 2001.

ABSTRACT. Bacteriological methods are the most important to diagnose pulmonary tuberculosis. The culture medium most used to isolate mycobacteria is Löwenstein-Jensen (LJ), which is a solid medium containing eggs, glycerol and asparagine as carbon and nitrogen source. The eggs used to prepare the medium need a previous cleaning, consisting of brushing with water and soap, and decontamination with 70% alcohol during 30 minutes. This procedure takes time; besides it is not so

simple to organize the acquisition of fresh eggs. With the purpose of simplifying the whole procedure of making medium, we propose the replacement of "in natura" by dehydrated eggs. This study compares the performance of conventional LJ and LJ made with dehydrated eggs. Clinical specimens sent to the laboratory for tuberculosis diagnosis were decontaminated by Petroff method and inoculated in tubes of conventional LJ and the test LJ. It was used 200 clinical specimens, 150 were smear positive and 50 smear negative. Among the 150 samples smear positive 123 were positive in traditional LJ and 24 were culture negative, while in the test LJ 121 were positive and 26 were negative. The difference was not significant. Three cultures were contaminated in both media. Comparison of the two media showed a sensibility of 98% and specificity of 100% The conclusion is that the dehydrated egg could be an alternative way to make LJ medium, propitiating a simpler and more practical medium preparation.

KEY WORDS. culture medium, Löwenstein-Jensen, tuberculosis, dehydrated egg.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Stop TB and the source. WHO report on the tuberculosis epidemic. Geneva: WHO publication WHO/TB/95.183, 1995.
2. Aoki, Y.; Yamada, H. Clinical application of microplate DNA-DNA hybridization procedure for rapid diagnosis of mycobacterial infections. **Tubercle and Lung Dis.**, 75:213-219, 1994.
3. Barnes, P.E. Rapid diagnostic tests for tuberculosis progress but no gold standard. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 155:1497-1498, 1997.
4. Eisenach, K.D.; Cave, D.; Bates, J.J.; Crawford, J.T. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Infect. Dis.**, 161:977-981, 1990.
5. Guerrero, C. *et al.* A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. **J. Clin. Microbiol.**, 32(2):304-307, 1995.
6. Thierry, D. *et al.* IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Nucleic Acids. Res.**, 18(1):188, 1990.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**, 2ª edição, Rio de Janeiro, 1994.
8. Karel, M. Dehydration of food. In: Karel, M.; Senenna, O.R.; Lund, D.B. **Principles of Food Science, part II**, p.342-346, Owen R. Senenna Ed., New York, 1975.
9. Bier, O. **Microbiologia e Imunologia**. 24ª edição. São Paulo. Melhoramentos, 1985. p. 1062.
10. São Paulo. Instituto Adolfo Lutz; Faculdade de Saúde Pública da USP. **Microbiologia Aplicada ao Diagnóstico de DST/AIDS**, 100p, 1994.
11. Gava, J.A. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. Livraria Nobel S.A., São Paulo, 1984, p. 312.
12. Brennan, J.G.; Butter, J.R.; Cowell, N.D.; Lilly, A.E.V. **Las operaciones de la ingeniería de los alimentos**. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1980, p.341-9.

Recebido em 02/08/2001; Aprovado em 07/02/2002