

# Estudo comparativo entre técnicas de Löwenstein–Jensen e do sistema MB/BacT™ no isolamento de micobactérias

## Löwenstein–Jensen and MB/BacT™ System – a comparative study on isolation of mycobacteria

RIALA6/1029

Andréa G. V. COELHO\*; Liliana A. ZAMARIOLI; Clemira M. P. V. REIS; Teresa Á. R. Figueiredo.

\* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Santos, Seção Biologia Médica, Área de Micobactérias, Rua Silva Jardim, 90, Vila Nova, Santos – SP, CEP11015-020 – Tel: (13) 3232-5112 – e-mail: dea\_gobetti@hotmail.com.

Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Santos.

Recebido: 04/08/2004 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

### RESUMO

Dentre as estratégias para se combater a tuberculose, o diagnóstico precoce se destaca como um dos pilares mais importantes no combate a doença, pois permite a atenção e início ao tratamento e como consequência minimiza os riscos de contágio e dispersão da enfermidade. Com o objetivo de avaliar o desempenho do sistema automatizado MB/BacT™ e do método convencional com cultivo em meio Löwenstein – Jensen (LJ) no isolamento de micobactérias de espécimes clínicos de origem pulmonar, foram analisados os exames de 1.317 pacientes com suspeita clínica de tuberculose pulmonar e/ou micobacterioses. Destas o sistema automatizado MB/BacT™ detectou 327 (24,8%) culturas positivas para micobactérias e o meio LJ 257 (19,5%), a sensibilidade do sistema MB/BacT™ foi de 98% e a especificidade 99%. Observou-se ainda um menor prazo de isolamento e menor contaminação por meio de sistema automático. Esta característica possibilita efetuar uma intervenção rápida e eficaz no tratamento, representando benefícios para os pacientes e ao Programa de Controle da Tuberculose.

**Palavras-Chave.** *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico automatizado, MB/BacT™, meio Löwenstein–Jensen.

### ABSTRACT

Among the strategies to combat the tuberculosis, the precocious diagnosis stands out as one of the most important pillars for disease control, because it allows the attention and beginning of the treatment, and as a consequence it minimizes the transmission risks and spreading of disease. With the objective in evaluating the performance of the automated MB/BacT™ system and the conventional method with cultivation in Löwenstein - Jensen (LJ) medium for mycobacteria isolation from pulmonary specimens, clinical samples from patients with presumed symptoms of pulmonary tuberculosis and/or mycobacterioses have been studied. Of 1,317 samples . 327 (24.8%) presented positive culture results on automated MB/BacT™ system, while culture on LJ medium detected 257 (19,5%) positive samples. Sensitivity and specificity of automated system was 98% and 99%, respectively. Comparing both techniques, the automated system presented culture positivity in shorter period of time and a lower contamination rate was observed. These characteristics of automated system allow a fast and effective intervention for treatment, representing benefits for the patients and for the Tuberculosis Control Program.

**Key Words.** *Mycobacterium tuberculosis*, automated diagnosis, MB/BacT™, Löwenstein-Jensen medium.

## INTRODUÇÃO

De todas as doenças infecciosas, a tuberculose é uma das que apresentam maior morbidade e mortalidade.

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), a tuberculose é responsável por 2,7 milhões de mortes anuais, das quais 95% ocorrem em países em desenvolvimento. Projeções feitas em 1995 indicam que, no ano 2005, ocorrerão 11,9 milhões de casos novos da doença anualmente<sup>1,2</sup>.

Na América Latina estima-se a ocorrência de 250 a 300 mil novos casos por ano, com cerca de 20 a 25 mil mortes<sup>3</sup>. O Brasil é o décimo país do mundo em número de casos, com cerca de 90.000 casos novos e mais de 5.000 mortes anuais. Destes 48% se encontram na região Sudeste, da qual faz parte o Estado de São Paulo, que por sua vez possui o maior número absoluto de casos do país, apresentando na última década uma incidência de cerca de 17.000 casos novos por ano e um coeficiente oscilando entre 50 e 60 por 100.000 habitantes<sup>1,2,4-6</sup>.

Surtos da doença por cepas multiresistentes e o aumento da incidência de infecções causadas por outras espécies de micobactérias impuseram a necessidade do desenvolvimento de novos métodos diagnóstico para estas infecções<sup>7</sup>.

Dentre as estratégias para se combater a tuberculose, o diagnóstico precoce se destaca como um dos pilares mais importantes no combate a doença, pois permite a atenção e início ao tratamento e como consequência minimiza os riscos de contágio e dispersão da enfermidade.

As técnicas bacteriológicas utilizadas atualmente no diagnóstico da tuberculose como a microscopia com coloração de Ziehl-Neelsen (BK) e o cultivo bacteriano em meio de Löwenstein–Jensen (LJ), são métodos convencionais importantes tanto para a confirmação do diagnóstico como para o controle de tratamento da doença, mas não permitem aprimorar os erros para desenvolver estratégias de erradicação a médio e em longo prazo da doença<sup>8</sup>.

O BK realizado pela maioria dos laboratórios clínicos, de baixo custo, reproduzível, fornece rapidamente o resultado; diagnóstica enfermos com tuberculose ativa, isto é, que são fontes de disseminação da doença, mas apresenta baixa sensibilidade quando comparada com o isolamento das micobactérias em meio de cultura sólido ou líquido<sup>8-11</sup>.

Embora alguns progressos na detecção direta de micobactérias por metodologias moleculares estejam sendo realizadas, as metodologias de cultura ainda são indispensáveis para o diagnóstico<sup>12,13</sup>. A cultura de micobactérias convencional LJ é importante, pois devido a sua elevada sensibilidade, aumenta a cobertura diagnóstica e possibilita o diagnóstico de casos paucibacilares, cuja positividade não é detectada pela microscopia<sup>14</sup>. Entretanto apresenta como grandes desvantagens a detecção tardia do crescimento das micobactérias (30 a 60 dias), pois necessita da visualização de colônias da bactéria no meio de cultura, e uma taxa de isolamento inferior àquela obtida com a utilização de meios líquidos<sup>10,13,15</sup>.

Com as técnicas de hoje, morosas frente à atual epidemiologia da tuberculose, o diagnóstico rápido das micobacterioses vêm sendo um desafio constante aos Programas de Combate a doença, causando sérios transtornos que se evidenciam em pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

Na tentativa de isolamento mais rápido das micobactérias, na década de 1980 foi proposto o sistema semi-automatizado BACTEC 460TB<sup>7,16</sup>, utilizado para a detecção, identificação e provas de sensibilidade aos antimicrobianos, mostra resultado rápido quando comparado com métodos convencionais; baseia-se na detecção de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) marcado com <sup>14</sup>C. Por ser uma técnica radiométrica e semi-automatizada, apresentou desvantagens que impediram o seu uso em grande escala<sup>16,17</sup>.

Recentemente, a fim de se diminuir o tempo entre a suspeita clínica e a detecção das micobactérias, vários métodos não radiométricos foram avaliados<sup>12,18,19</sup>.

Em 1999, o programa de DST/AIDS iniciou uma discussão junto ao Programa de Tuberculose, sobre a necessidade da melhoria da qualidade do diagnóstico da tuberculose, a fim de se conduzir a um tratamento rápido e eficaz; principalmente em pacientes com sorologia positiva para o HIV<sup>20</sup>. Assim, em novembro de 2001 foi implantada pelo Programa Estadual de DST/AIDS, a realização da cultura pelo sistema automatizado MB/BacT™, neste Laboratório Regional de Referência do Estado de São Paulo - DIR XIX, devido ao elevado índice de co-infecção HIV/TB, na região.

O objetivo deste estudo foi avaliar o sistema automatizado MB/BacT™, pela análise comparativa das taxas de sensibilidade, especificidade e precocidade no isolamento de micobactérias, com o método convencional em meio de Löwenstein-Jensen (LJ).

## MATERIAL E MÉTODO

Foram processados no Laboratório de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz – Santos/SP (IAL), pelos métodos automatizado e convencional, MB/BacT™ e LJ respectivamente, 1.317 espécimes clínicos de origem pulmonar, coletados de pacientes sintomáticos respiratórios ou com suspeita clínica de tuberculose pulmonar e/ou micobacterioses, atendidos nas Unidades Básicas de Saúde da Baixada Santista entre janeiro de 2002 a dezembro de 2003.

### Procedimentos Bacteriológicos

Baciloscopia: esfregaços de cada amostra coletada foram corados pelo Método de Ziehl-Neelsen. No caso de lâminas positivas realizou-se a contagem bacilar semiquantitativa conforme o índice bacilosκόpio recomendado pelo MS<sup>8,21</sup>.

Cultura: após digestão e descontaminação pelo Método de Petroff<sup>8,22</sup>, os espécimes clínicos foram semeados em Meio de Löwenstein – Jensen (LJ) e meio middlebrook 7H<sub>9</sub> do sistema

MB/BacT™ contendo 0,5ml de Solução Reconstituente. Os meios de LJ foram incubados a 37°C em estufa bacteriológica por até 60 dias. Os frascos de meio de cultura MB/BacT™ foram colocados no Módulo de Incubação do Sistema Automatizado, que consiste numa estufa bacteriológica a 37°C, com monitoramento contínuo, e inspecionados por 42 dias. As culturas positivas foram confirmadas quanto à presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), pela observação de esfregaços corados pelo método Ziehl-Neelsen<sup>8,21</sup>.

As culturas do sistema automatizado onde se detectou a presença de microrganismos contaminantes foram novamente descontaminadas pelo método de Petroff e semeadas em novo meio de cultura do sistema MB/BacT™.

Leitura dos Frascos: o sistema automatizado monitoriza continuamente a produção de CO<sub>2</sub> pelos microrganismos com base na leitura dos refletômetros de fase sólida sensíveis ao CO<sub>2</sub><sup>3,10</sup>, pelo tempo mínimo de 42 dias. Todos os meios LJ inoculados são lidos uma vez por semana até o 60º dia.

Identificação: culturas positivas foram encaminhadas ao IAL Central que realizou a identificação de acordo com as técnicas preconizadas pelo Ministério da Saúde; observando-se a pigmentação das colônias, aspecto e realização de provas bioquímicas<sup>8,21</sup>.

## RESULTADOS

A comparação entre os resultados obtidos na detecção das micobactérias em meio de Löwenstein–Jensen (LJ) e meio middlebrook 7H<sub>9</sub> do sistema MB/BacT™, encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Comparação entre os resultados obtidos no processamento das 1.317 amostras clínicas, para o isolamento de micobactérias, nos meios de Middlebrook 7H<sub>9</sub> do MB/BacT™ e Löwenstein-Jensen, processadas no Laboratório de Micobactérias do IAL – Santos/SP, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2003.

Meios de Cultura	Total de Amostras	Resultados		
		Positivo (%)	Negativo (%)	Contaminado (%)
Middlebrook 7H <sub>9</sub> do MB/BacT™	1.317	327 (24,8%)	943 (71,6%)	47 (3,6%)
Lowenstein - Jensen	1.317	257 (19,5%)	934 (71%)	126 (9,5%)

**Tabela 2.** Resultado do retratamento das 116 culturas contaminadas em meio Middlebrook 7H<sub>9</sub> do MB/BacT™, processadas no Laboratório de Micobactérias do IAL – Santos/SP, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2003.

Total amostras processadas	Total amostras retratadas	Resultado das amostras retratadas		
		Positivas (%)	Negativas (%)	Contaminadas (%)
1.317	116	36 (2,7%)	33 (2,5%)	47 (3,6%)

Efetuando-se cálculos estatísticos para determinação dos valores de concordância entre o sistema automatizado MB/BacT™ e o LJ obteve-se: 94% de concordância bruta, 63% concordância esperada e 85% de concordância ajustada (Kappa). O método automatizado apresentou satisfatória taxa de sensibilidade (98%) e especificidade (99%), com os valores preditivos positivos e negativos de 81% e 99 %, respectivamente; demonstrando assim que a metodologia empregada no sistema MB/BacT™ apresenta boa acurácia.

O sistema automatizado MB/BacT™ detectou 327 (24,8%) culturas positivas, sendo que 185 (14%) com resultado positivo na baciloscopia direta e 142 (10,8%) com resultado negativo. Com o meio LJ foram detectadas 257 (19,5%) culturas positivas para micobactérias (Tabela 1).

O tempo médio de positividade pelo sistema automatizado MB/BacT™ foi de 16 dias, (68% das amostras positivas foram detectadas até o 20º dia de incubação), sendo que pelo método convencional houve um acréscimo médio de duas semanas.

Analisamos a expressão de crescimento da micobactéria nos dois métodos em relação ao tempo, representado em dias (Figura 1).

Na identificação com testes fenotípicos das espécies tivemos no sistema MB/BacT™ 80,4% destas pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Tabela 3).

## DISCUSSÃO

Uma das melhores medidas para se prevenir à disseminação da tuberculose é o diagnóstico rápido e preciso

da doença. Pelas características de crescimento lento do bacilo, a detecção do bacilo em meio de cultura, na melhor das hipóteses é de três semanas, representando atraso no início do tratamento e assim, com conseqüências para a sobrevida do paciente, principalmente para os pacientes co-infectados, onde muitas vezes é freqüente a ocorrência de doença causada por micobactérias não tuberculosas.

Ao se fazer o diagnóstico de infecções por micobactérias, os pontos mais importantes que devem ser atingidos são: liberação de resultado do exame microscópico no prazo máximo de 24h após o recebimento da amostra no laboratório; detecção dos bacilos álcool – ácido - resistentes em no máximo 14 dias; realização da identificação no máximo entre 17 a 21 dias; e disponibilização para o médico da

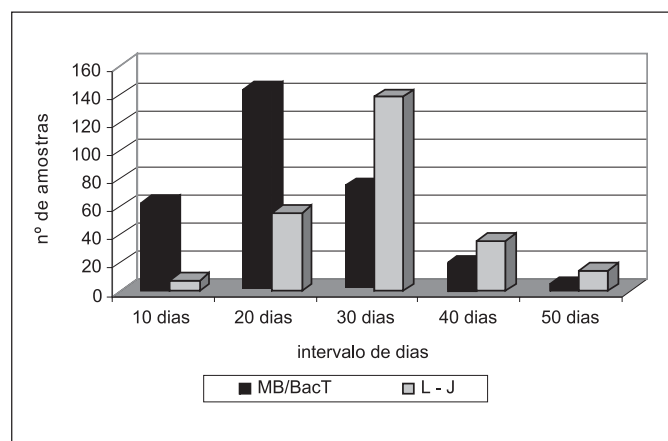
sensibilidade da micobactéria aos tuberculostáticos dentro de no máximo 28 dias<sup>7</sup>.

Em nosso estudo, a baciloscopia detectou apenas 14% das culturas positivas no método automatizado, deixando clara a sua baixa sensibilidade. Em comparação ao método LJ, o sistema MB/BacT™ revelou-nos, uma maior positividade e rapidez na detecção.

O MB/BacT™ detectou-se 327 culturas positivas para micobactérias e o meio de LJ detectou apenas 81% dessas culturas, sendo assim o sistema automatizado apresentou uma taxa de detecção 33% maior do que no método convencional LJ. Porcentagens estas semelhantes à encontrada por Rohner et al.<sup>19</sup> e Manterola et al.<sup>23</sup> que relatam respectivamente os valores de 79,5% e 92,5% de positividade, com meio a base de ovos.

O tempo médio de detecção foi menor (16 dias) quando comparado ao convencional (24,7 dias); essa detecção tardia em meios sólidos nos deixa claro a vantagem da utilização de um sistema automatizado, que possibilite maior agilidade na realização dos testes de identificação, uma vez que em nossos estudos 19,6% das cepas eram outras micobactérias (MNT); sendo 5,5% ao *Mycobacterium kansasii*, e 3,4 % ao *Mycobacterium avium*, espécies estas com alta freqüência de isolamento em doenças pulmonares humanas<sup>14</sup>.

Diversos estudos mostram que o meio líquido é mais sensível para a detecção do crescimento de micobactérias, por ser um meio rico em nutrientes, mas algumas vezes apresenta um índice de contaminação mais elevado do que o meio sólido<sup>12,13</sup>. Em nossos estudos a porcentagem de contaminação das culturas por outros microrganismos foi inicialmente de 8,8% para o meio middlebrook 7H<sub>9</sub> do sistema MB/BacT™ e de 9,5% para o LJ. A menor porcentagem pode ser explicada pelo uso de antibióticos no meio de cultura desse sistema, como também à encontrada nos estudos de Aily et al.<sup>12</sup> que relatam 24% para o MB/BacT™ e 27,3% para o LJ.



**Figura 1.** Comparativo entre o tempo de crescimento das culturas processadas pelo método convencional L-J e automatizado MB/BacT™, processadas no laboratório de Micobactérias do IAL – Santos/SP, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2003 .

**Tabela 3.** Espécies isoladas nas culturas positivas nos meios de Middlebrook 7H<sub>9</sub> do MB/BacT™ e meio Löwenstein–Jensen, processadas no Laboratório de Micobactérias do IAL – Santos/SP, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2003 .

Espécies isoladas	Meio de cultura			
	Middlebrook 7H <sub>9</sub> do MB/BacT™		Löwenstein-Jensen	
	nº	%	nº	%
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	263	80,4	223	86,7
<i>Mycobacterium avium</i>	11	3,4	4	1,5
<i>Mycobacterium kansasii</i>	18	5,5	16	6,2
<i>Mycobacterium terrae e triviale</i>	1	0,3	1	0,4
<i>Mycobacterium cresc. lento</i>	3	0,9	1	0,4
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1	0,3	0	0
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	7	2,1	4	1,5
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	2	0,6	1	0,4
<i>Mycobacterium cresc. rápido</i>	0	0	1	0,4
outras	21	6,4	6	2,3
<b>Total</b>	<b>327</b>	<b>100</b>	<b>254</b>	<b>100</b>

Importante enfatizar que em nosso estudo utilizamos para a descontaminação das amostras de escarro o método de Petroff e não o método de N-acetil-L-cisteína/ NOH, como indicado pelo fabricante, pelo fato deste fazer parte da nossa rotina laboratorial e ser o método mais usado no Brasil<sup>8</sup>.

O retratamento das culturas do sistema MB/BacT<sup>TM</sup> em que se detectou presença de microrganismos contaminantes, possibilitou um aumento de 2,7% de culturas positivas, diminuindo a taxa de contaminação para 3,6% (Tabela 2). Devido as suas características, uma contaminação da cultura em meio sólido impossibilita o retratamento, sendo assim essa cultura é descartada e o diagnóstico interrompido, fazendo-se necessário a solicitação de nova amostra.

Ao analisar os dados obtidos na comparação dos dois métodos, os autores ressaltam a importância de uma metodologia automatizada de detecção do crescimento bacteriano, como o MB/BacT<sup>TM</sup>, pois este agiliza os testes de identificação e sensibilidade às drogas, possibilitando uma intervenção rápida e eficaz no tratamento, representando benefícios para os doentes; justificando assim a sua implantação à rotina laboratorial em programas de combate à tuberculose.

## REFERÊNCIAS

1. Hiijar MA. Epidemiologia da tuberculose no Brasil. *Inf Epidemiol SUS* 1992; 53-7.
2. Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. A Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 1995; 273:220 – 6.
3. Guevara A, Juárez A, Zenteno R. Tuberculosis y la importancia de incorporar nuevas metodologías diagnósticas. *MEDUNAB* 2003; 6 (16): 46-51.
4. Galesi VMN & Santos LAR Tuberculose: A cura em estado de alerta. *Rev Prática Hospitalar* 2004; 32: 37-4.
5. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária. Manual de normas para o controle da tuberculose. Brasília (DF), 1995.
6. Nogueira PA et al. Avaliação das informações de tuberculose (1989-1999) de um Centro de Saúde Escola da cidade de São Paulo. *Rev Bras Epidemiol* 2001; 4 (2): 131-9.
7. Tenover FC et al. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* 1993; 31: 767-70.
8. Ministério da Saúde, Programa Nacional de Combate da Tuberculose. Manual de Bacteriologia da Tuberculose, 2ª. ed. Rio de Janeiro. Fundação Nacional da Saúde, 1994.
9. Colebunders R; Bastian I. A review of the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 97-107.
10. Jamal L F, Palhares MCA . Tuberculose em pacientes infectados pelo HIV experiência de um serviço de referência para DST/AIDS em São Paulo. *Bol de Epidem* 1999; 7(1): 87-90.
11. Wolinsky E. Convencional diagnostic methods for tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 396-401.
12. Aily DCG. et al. Isolamento de micobactérias em espécimes clínicos utilizando o sistema automatizado MB/BacT<sup>TM</sup>. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2003; 62(3): 233-7.
13. Oplustil CP et al. Impacto da automação no diagnóstico de infecções por micobactérias. *J Bras Patol Med Lab* 2002; 38(3): 167-73.
14. Silva EAM et al. Ocorrência de infecção pulmonar devida ao *Mycobacterium kansasii*, em São Paulo, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1987; 47: 11-7.
15. World Health Organization. (Laboratory Services in Tuberculosis Control.) Part III: Culture. Geneve, 1998.
16. Roberts GD et al. Evaluation of Bactec radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear positive specimens. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 689-96.
17. Conville PS , Witebsk FG. Inter-bottle transfer of mycobacteria by the BACTEC 460. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989;12:401-5.
18. Alcaide F et al. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/BacT systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens an for species identification by DNA AccuProbe. *J Clin Microbiol* 2000;38(1): 398-401.
19. Rohner P. et al. Evaluation of the MB/BacT system in comparison to the BACTEC 460 system and solid media for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35(12): 3127-3131.
20. Galesi VMN. Mortalidade por tuberculose no Município de São Paulo, análise de uma década, 1986 a 1995 [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 1999.
21. Kent PT , Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta, US Department of Health and Human Services, 1985.
22. Petroff SA . A new rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from sputum and feces. *J Exp Med* 1915; 21:38.
23. Manterola JM et al. Comparison of a non radiometric system with BACTEC 12B and Culture on Egg-based Media for Recovery of Mycobacteria from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 773-7.