

Evaluación de medios de cultivo alternativos para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar

Lina María López*
Carlos Ignacio Vélez*
Liliana María Zuluaga*
Gloria Isabel Mejía Bact.***
Santiago Estrada MD.**
Patricia Posada Bact.**
Sandra Moreno Bact.***
Angela Guzmán Bact.***
Jaime Robledo MD.***

Resumen

Objetivos: el uso de nuevos métodos que proporcionen rapidez al diagnóstico es necesario en laboratorios que hacen diagnóstico de tuberculosis y no poseen recursos para el uso de tecnología costosa. Nuestro objetivo fue evaluar MGIT (mycobacterial growth indicator tube) comparativamente con el cultivo en Ogawa-Kudoh (OK) y el cultivo en agar de capa delgada (CD) para el diagnóstico de tuberculosis. **Materiales y métodos:** se procesaron 218 muestras de esputo en 1 año, en pacientes con diagnóstico clínico de tuberculosis. Todas las muestras se decontaminaron por un método estándar y se les realizó coloración directa de Kinyoun. **Resultados:** De las 218 muestras 15.1% fueron positivas por CD, 24.3% lo fueron por MGIT y 24.7% lo fueron por OK. La sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos y la eficiencia se calcula-

ron para MGIT y capa delgada con respecto a OK y fueron respectivamente 84.0%, 94.1%, 87.5%, 92.3%, 90.8% en MGIT y para CD 71.1%, 99.1%, 96.9%, 90.0%, 91.4%. La frecuencia de contaminación fue 11.4%, 20.6% y 22.9% para OK, CD y MGIT respectivamente. En los primeros 15 días fueron positivas el 56.2% de las muestras en CD, el 38.8% en MGIT y el 7.2% en OK. MGIT fue más sensible en muestras paucibacilares 15.5%, con respecto a OK 4.6% y CD 5.6%. **Conclusión:** El MGIT y la CD son alternativas para incrementar la rapidez en el diagnóstico de tuberculosis, el MGIT provee mayor sensibilidad en muestras paucibacilares. **Palabras clave:** Mycobacterial growth indicator tube, agar de capa delgada, cultivo *M. tuberculosis*. [b](#)

Infectio 2001; 5(4): 235-240

* Estudiante Facultad de Medicina Instituto de Ciencias de la Salud CES, Medellín, Colombia

** Laboratorio Departamental de Salud Pública, Dirección Seccional de Salud de Antioquia, Medellín, Colombia

*** Unidad de Bacteriología y Micobacterias, Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB, Medellín, Colombia

Correspondencia: Jaime Robledo R., MD
Corporación para Investigaciones Biológicas
Carrera 72ª No. 78B-141
Medellín, Colombia
Email: robledo.j@epm.net.co

Introducción

En la última década la infección por el bacilo de la tuberculosis ha tomado gran importancia en el mundo. En 1992 la enfermedad fue definida como re-emergente, debido al aumento persistente en el número de casos (1, 2).

Según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, la tercera parte de la población mundial (1.7 billones de personas) está infectada por *M. tuberculosis* y los más afectados son los países en vía de desarrollo. Se calcula que anualmente en el mundo, se registran 8 millones de casos nuevos y suceden 3 millones de muertes por esta causa (3). Para finales del año 2000 se esperaba documentar, 7.6 millones de casos nuevos en los países en desarrollo y 400.000 en las naciones industrializadas (4)

En Colombia, en 1995, un 1/3 a 1/4 de la población estaba infectada por *M. tuberculosis* con un promedio de 10.000 enfermos nuevos por año y una tasa de incidencia de 39/100.000 habitantes. Adicionalmente, se reconocen más de 1000 muertes anuales por esta causa (5).

Diversos métodos de diagnóstico para tuberculosis han sido implementados con el afán de hacerlo más rápido e instaurar un tratamiento efectivo. Entre ellos están los métodos de amplificación genómica como PCR (6,7,8) el cultivo y detección radiométrica como el BACTEC (9,10,11) y más recientemente métodos de cultivo y detección automatizada por métodos no radiométricos como son la nueva generación de BACTEC-MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube, BBL Sparks, MD, USA), el MB/BacT Alert (Organon Teknika) y el ESPII (Difco, USA) (12). Entre ellos se destaca como uno de los desarrollos más recientes el MGIT pues además de poderlo utilizar en formato de detección automatizada, presenta la facilidad de poderlo leer manualmente (13).

Adicionalmente y desde hace varios años se describió el método de cultivo de la capa delgada y se mostró que permitía la detección de

colonias en un período promedio de 7 a 10 días a partir de la siembra inicial de la muestra (14,15). En el laboratorio de la unidad de Bacteriología de la CIB, se ha adaptado este método de cultivo y se demostró que su sensibilidad y especificidad son similares a la de los cultivos tradicionales, 83% y 93% respectivamente y la detección de positividad se dio en un promedio de 10 días contra un promedio de 20 días con los cultivos tradicionales (16). Estos resultados indican que el método de la capa delgada tiene rapidez similar a la reportada para los métodos automatizados y radiométricos (9,10,11), pero con la ventaja de ser considerablemente menos costoso y de fácil implementación en los laboratorios involucrados con el control de la tuberculosis.

El propósito de este estudio fue comparar la sensibilidad, valores predictivos, eficiencia y rapidez en detección de crecimiento de *M. tuberculosis* en tres medios de cultivo, uno tradicional como lo es el Ogawa-Kudoh, el MGIT y el cultivo en capa delgada.

Materiales y Métodos

Se estudiaron 218 muestras de esputo de pacientes que consultaron por primera vez al Hospital La María y al laboratorio Central de Metrosalud, con un diagnóstico clínico de tuberculosis. Las muestras se guardaron en refrigeración hasta su transporte y fueron procesadas en el Laboratorio Departamental de Salud Pública y en la Unidad de Bacteriología y Micobacterias de la Corporación para Investigaciones Biológicas siguiendo los mismos protocolos.

Cada muestra se procesó siguiendo métodos estandar (17) de acuerdo al siguiente protocolo: decontaminación con N-acetil cisteína, NaOH al 2%, seguida por centrifugación a 4000 RPM por 30 minutos, del sedimento obtenido se sembraron 0.5 ml en cada uno de los tres medios, el sedimento además se utilizó para examen directo con coloración por el método de Kinyoun (17). La presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) se contabilizó de

acuerdo a métodos recomendados (17). El medio de cultivo de OK utilizado en el estudio fue fabricado por el Laboratorio Departamental siguiendo métodos recomendados (18), el cultivo de CD utilizado en todas las muestras fue fabricado en la CIB siguiendo igualmente métodos recomendados (17) y los tubos de MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube, Becton Dickinson and Company, Sparks MA, USA) se obtuvieron de un proveedor local.

La lectura de OK se realizó visualmente una vez por semana, la CD se observó dos veces por semana utilizando un microscopio convencional con aumento de 100X y la lectura de crecimiento en MGIT se realizó manualmente dos veces por semana utilizando una lámpara de fluorescencia.

La positividad se consignó cuando en OK se observaron colonias compatibles con *M. tuberculosis*, en capa delgada cuando se observaron microcolonias compatibles y en MGIT cuando se observó fluorescencia. El crecimiento en cualquiera de los medios se confirmó por la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes por medio de una coloración de Kinyoun y la identificación definitiva se realizó utilizando pruebas bioquímicas convencionales (17).

Los tres medios se compararon de acuerdo a la rapidez en crecimiento de los cultivos positivos, la sensibilidad, valores predictivos y la eficiencia se calcularon para MGIT y capa delgada utilizando como estándar de oro el medio de Ogawa-Kudoh.

Resultados

Se procesaron 218 muestras de las cuales 88.5% fueron paucibacilares (no se observaron bacilos ácido alcohol resistentes en el examen directo) y 6.8% tuvieron 3 cruces (+++) de BAAR.

Comparados con el cultivo de Ogawa-Kudoh la sensibilidad de capa delgada y el medio de MGIT fueron 71.1% y 84.0%, la especificidad 99.1% y 94.1% respectivamente, los valores

predictivos positivos y negativos fueron 96.9% y 90.0% para CD y 87.5% y 92.3% para MGIT respectivamente, la eficiencia fué de 91.4% para CD y de 90.8% para MGIT. Se observó una alta frecuencia de contaminación para los medios de capa delgada 20.6% y MGIT 22.9%, la contaminación observada para el medio de OK fue 11.4%.

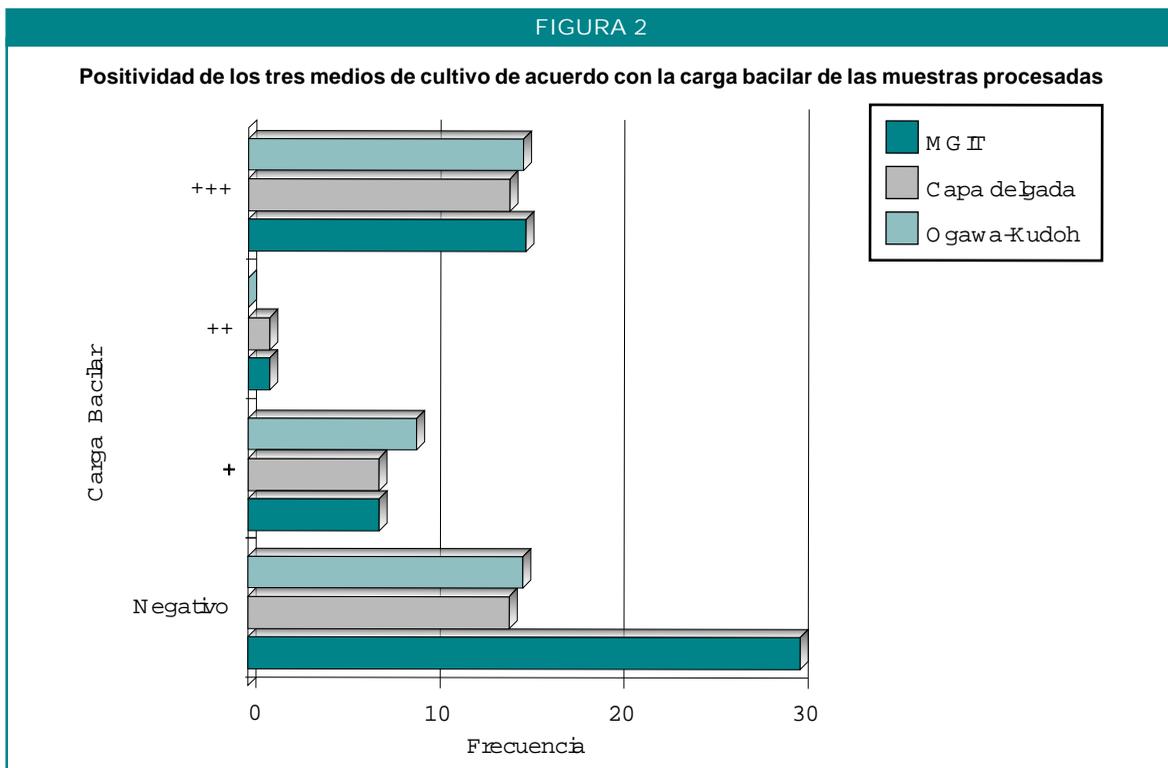
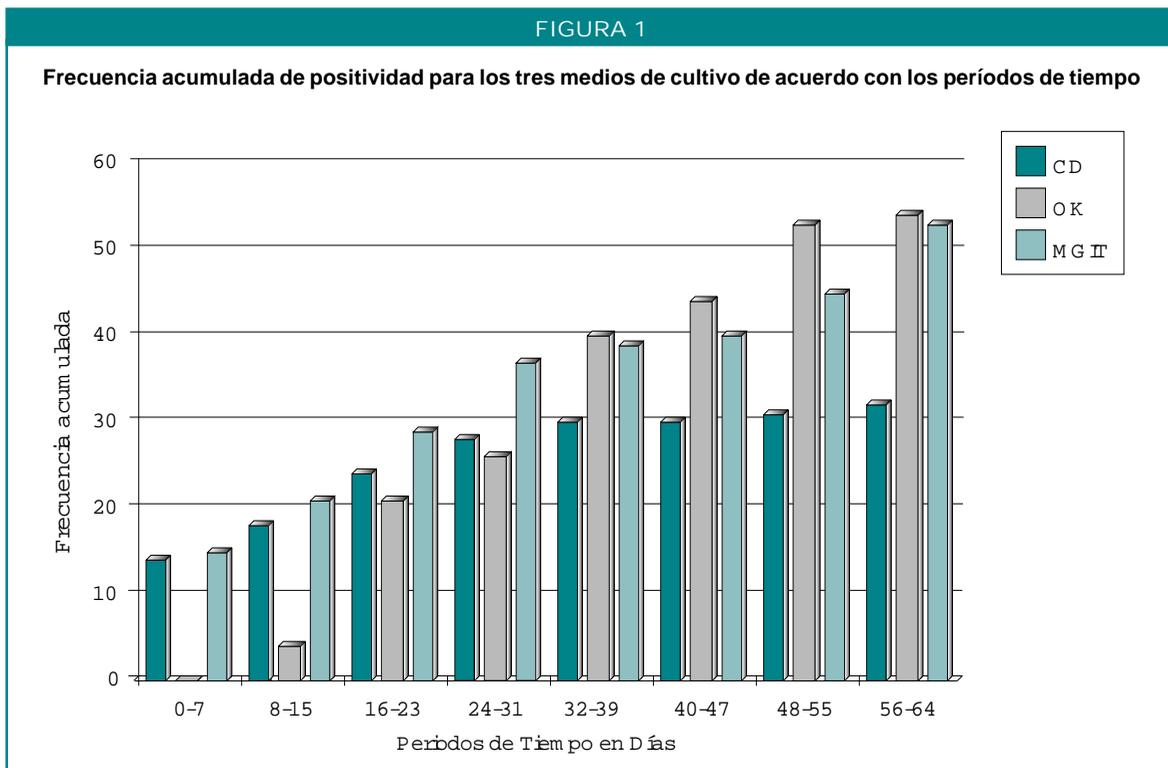
Con respecto a la rapidez en la detección de los cultivos positivos el promedio de CD fue de 16.8 días, la observada para MGIT fue de 26.3 días y para OK fue 30.6 días. De los cultivos positivos detectados por CD el 56.2% se detectaron en las primeras dos semanas, el MGIT necesitó tres semanas para detectar una cantidad de cultivos comparable y OK 4 semanas aproximadamente (figura 1).

De acuerdo a la carga bacilar de las muestras, el MGIT comparativamente con los otros medios utilizados fue más efectivo en detectar crecimiento 15.5%, en contraste con 4.1% para OK y 5.6% para CD (figura 2).

Discusión

De los tres métodos de cultivo utilizados la capa delgada fue el más rápido para detectar cultivos positivos, además puede proporcionar un resultado presuntivo rápido ya que la forma de las microcolonias es característica de *M. tuberculosis*. El MGIT a pesar de la detección rápida de los cultivos positivos, por ser un caldo requiere de subcultivo en medio sólido, para posterior identificación. La combinación de MGIT con métodos moleculares acelera la identificación precisa sin esperar la identificación con pruebas convencionales que pueden tardar varias semanas (19).

Se observaron cifras altas de contaminación para los tres medios lo cual puede explicarse por el transporte prolongado de las muestras antes de ser procesadas. Lo anterior, además de la falta de experiencia con estos nuevos métodos, también puede explicar los niveles más altos de contaminación tanto de capa delgada como de MGIT. Estudios publicados con



experiencias en ambos métodos muestran menores cifras de contaminación (15,16,19,20) y la experiencia reciente utilizando el sistema MGIT 960 de rutina en el laboratorio de Bacteriología y Micobacterias de la CIB, muestra cifras de contaminación de 7.5% (datos no publicados).

En este estudio la detección de crecimiento promedio para MGIT y CD fue más prolongada que la mostrada en otras experiencias publicadas (15,16,19,20), la experiencia actual en el laboratorio de Bacteriología y Micobacterias de la CIB, es de un promedio de detección de cultivos positivos de 10.6 días para CD y 9.8 días para MGIT (datos no publicados).

Particularmente importante fue el hallazgo de una mayor sensibilidad del MGIT en las muestras paucibacilares (BAAR negativas) con respecto a los otros dos medios utilizados. Esto indica que la adición de un medio de cultivo líquido, es un instrumento eficaz para el diagnóstico en muestras donde medios de cultivo sólidos y la tinción directa tienen menos sensibilidad.

Tanto la rapidez de la capa delgada como la mayor sensibilidad del MGIT en muestras paucibacilares pueden utilizarse para complementar la forma como se realiza el diagnóstico actual de la tuberculosis, un esquema que incluya un medio como Ogawa-Kudoh o Lowenstein/Jensen, uno de capa delgada y un medio líquido puede ser más efectivo en el diagnóstico que el esquema tradicional usado en nuestro medio.

Financiación

Cofinanciado por la Dirección Seccional de Salud de Antioquia, Laboratorio Departamental de Salud Pública y Corporación para Investigaciones Biológicas. El MGIT fue suministrado parcialmente por la compañía Rochem Biocare.

Agradecimientos

Al Hospital La María en Medellín y a Metrosalud, en especial al personal de labora-

torio, sin cuya ayuda no hubiera sido posible este estudio. **b**

Abstract

Objectives: the use of alternative culture methods for tuberculosis, which can provide faster diagnosis, is needed in those laboratories diagnosing tuberculosis which cannot afford expensive technology. Our goal was to evaluate the performance of MGIT (mycobacterial growth indicator tube, BBL) as compared to culture in Ogawa-Kudoh (OK) and thin layer agar (TLA). **Materials and methods:** during a period of one year, 218 sputum samples, from patients with a clinical diagnosis of tuberculosis were studied. A standard decontamination procedure was performed, then a smear for Kinyoun stain was carried out for each sample. A portion of each sample was cultured in each one of the compared methods. **Results:** of the total 218 clinical samples, 15.1% yielded positive cultures on TLA, 24.3% in MGIT and 24.7% on OK. Values for sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy were calculated for MGIT and TLA. For MGIT sensitivity was 84.0%, specificity 94%, PPV 87.5, NPV 92.3% and accuracy 90.8%. For TLA sensitivity was 71.1%, specificity 99.1%, PPV 96.9%, NPV 90.0% and accuracy 91.4%. The frequency of contamination was 11.4% for OK 20.6% for TLA and 22.9% for MGIT. During the first 15 days of culturing, 56.2% of samples were positive on TLA, 38.8% were positive on MGIT and 7.2% were on OK. The MGIT performed better for detecting *M. tuberculosis* in pauci-bacillar samples, 15.5% positive results in comparison with OK and TLA 4.6% and 5.6% respectively. **Conclusion:** MGIT and TLA provide effective means of decreasing the time to diagnosis, MGIT additionally, increases sensitivity for pauci-bacillar samples. Both methods could be used in the routine laboratories because of these important advantages. **Key words:** mycobacterial growth indicator tube, thin layer agar, *M. tuberculosis* culture.

Referencias

1. **Bloom BR, Murray CL.** Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 1992; 257: 1055-1064.
2. **Telzak EE, Turett G.** Mycobacterium diseases. In: Conn R, Borer WZ, Snyder JW, eds. *Current diagnosis*. 9th. de. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997; 152-6.
3. **World Health Organization.** *Global Tuberculosis Control*. Geneva: World Health Organization, 2000; document No. WHO/CDS/TB/2000.275.
4. **Snider GL.** Tuberculosis then and now: a personal perspective on the last 50 years. *Ann Intern Med*. 1997; 126: 237-243.
5. **Victoria J.** Informe epidemiológico Nacional Quinquenal. 1999; 4.
6. **Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT.** Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990; 161: 977-981.
7. **Del Portillo P, Murillo L, Patarroyo ME.** Amplification of a species-specific DNA fragment of *M. tuberculosis* and its possible use in the diagnosis. *J Clin Microbiol* 1992; 29: 2163-2168.
8. **Sierra MP, Robledo J, Murillo LA, Trujillo H, Mejía GI, Castrillón L.** Sensibilidad, especificidad y valor predictivo de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la enfermedad producida por *M. tuberculosis* de tipo paucibacilar. *Boletín Epidemiológico de Antioquia* 1995; XX: 192-206.
9. **Kirihara JM, Hiller SL, Cyle MB.** Improved detection times for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* with the Bactec radiometric system. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 841-845.
10. **Morgan MA, Horstmeier CD, DeYoung DR, Roberts GD.** Comparison of radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear negative specimens. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 384-388.
11. **Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, Larsh H, Lindner TH, McClatchy JK, McGinnis MR, Siddiqi SH, Wright P.** Evaluation of the 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: 689-696.
12. **Hall GS.** Primary processing of specimens and isolation and cultivation of mycobacteria. En: *Clinics in Laboratory Medicine*. Heifets LV, ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. pp: 551-567, 1996.
13. **BACTEC MGIT 960 System User's Manual.** Becton Dickinson and Company. Sparks, Maryland. May 1999.
14. **Runyon EH.** Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. *Am J Clin Pathol* 1970; 54: 578-586.
15. **Welch DF, Guruswamy AP, Sides SJ, Charles HS, Gilchrist MJ.** Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2178-2184.
16. **Mejía GI, Castrillón L, Trujillo H, Robledo J.** Microcolony detection in 7H11 thin layer culture is an alternative for the rapid diagnosis of *M. tuberculosis* infection. *Int J Tuberc Lung Dis*. 3(2): 138-142, 1999.
17. **Kent PT, Kubica GP.** *Public Health Mycobacteriology: A guide for the Level III Laboratory*. U.S Department of Health and Human Services. Center for Disease Control, Atlanta 1985.
18. **Tuberculosis: Manual de procedimientos.** Serie publicaciones científicas No. 1. Red Nacional de Laboratorios. Instituto Nacional de Salud. Bogotá 1985.
19. **Alcaide F, Benitez MA, Escriba JM, Martin R.** Evaluation of the Bactec MGIT 960 and MB/BACT systems for recovery of Mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA Accuprobe. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 398-400.
20. **N. Williams-Bouyer., R. Yorke., H.I. Lee., G. Woods.** Comparison of BACTEC MGIT and ESP Culture System II for growth and detection of Mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4167-4170.