

Isolamento de micobactérias em espécimes clínicos, utilizando o sistema automatizado MB/BacT™.

Mycobacteria isolation in clinical specimens using the MB/BacT™ system.

Dalva C. G. AILY²
Daisy N. SATO³

Maria Conceição MARTINS¹
Maria Alice da Silva TELLES¹

Rede Estadual de Laboratórios da Tuberculose

RIALA6/964

Aily, D.C.G. et al. - Isolamento de micobactérias em espécimes clínicos, utilizando o sistema automatizado MB/BacT™. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 233 - 237, 2003.

RESUMO. O aumento da incidência da tuberculose e outras micobacterioses têm demonstrado a importância de se isolar e identificar rapidamente as micobactérias. No período de março a dezembro de 2000 foram avaliados 791 espécimes clínicos coletados de pacientes com sorologia positiva para HIV. O sistema MB/BacT™ detectou 30,0% de amostras positivas, enquanto o meio Löwenstein Jensen 19,0%. As identificações das micobactérias foram realizadas pelo sistema molecular de DNA AccuProbe ou por provas fenotípicas. O Sistema Automatizado MB/BacT™ foi mais sensível e rápido para o isolamento de micobactérias que o método tradicional e, acoplado a um sistema de identificação molecular, poderá ser uma ferramenta útil para o Programa de Controle da Tuberculose.

PALAVRAS-CHAVE. *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico, coinfeção TB/HIV, MB/BacT™.

Rede Estadual de Laboratórios para o Diagnóstico e Controle da Tuberculose: Cacilda Rosa Cardoso da SILVA³; Cristina Abade MARABINI²; Heloisa Silveira Paro PEDRO⁴; José Peixoto HENARES³; Maria Izabel F. PEREIRA⁴; Maria Izilda Tavares PINI³; Maria Lúcia Ferreira OLIVEIRA²; Maria do Rosário Assad GOLONI⁴; Rosângela Mendes SILVA².

1 - Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Central

2 - Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Campinas

3 - Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Ribeirão Preto

4 - Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de São José do Rio Preto

INTRODUÇÃO

A disseminação da tuberculose acompanhou o desenvolvimento dos grandes centros urbanos e dos aglomerados populacionais e seu controle só foi possível com a identificação de seu modo de transmissão e a produção de drogas eficazes para o seu tratamento¹².

Com o advento da AIDS esse quadro teve uma alteração significativa, pois a infecção pelo HIV é o maior fator de risco conhecido para o desenvolvimento da tuberculose. A incidência de adoecimento num indivíduo HIV positivo é de 7 a 10% ao ano, enquanto que no HIV negativo é de 10% ao longo de sua vida¹³.

As técnicas bacteriológicas para detecção do *Mycobacterium tuberculosis* são importantes tanto para a confirmação do diagnóstico quanto para o controle de tratamento da doença. A microscopia é de baixo custo, altamente reproduzível, possibilita fornecimento rápido do resultado mas apresenta uma baixa sensibilidade quando comparada com o isolamento das micobactérias, em meio de cultura sólido ou líquido^{3,6,14}.

A cultura de micobactérias é importante pois permite o diagnóstico de casos paucibacilares, cuja positividade não é detectada pela microscopia, possibilita a identificação das espécies e a realização do teste de susceptibilidade às drogas. A principal desvantagem, quando se usa os métodos convencionais, é a demora de 30 a 60 dias para obtenção do resultado¹¹.

Na tentativa de isolamento mais rápido das micobactérias, foi proposto na década de 1980 o sistema BACTEC 460TB®, baseado na detecção de gás carbônico (CO₂) marcado com ¹⁴C. Esta técnica, por ser semi-automatizada e radiométrica, apresentou uma série de desvantagens que impediu o seu uso em larga escala⁵.

Recentemente, vários métodos não radiométricos e com monitoramento contínuo de crescimento bacteriano foram avaliados no sentido de diminuir o tempo entre a suspeita clínica e a detecção das micobactérias^{1,10,11}.

Após o isolamento, para a identificação rápida das espécies patogênicas ou potencialmente patogênicas, têm sido proposto o uso de sondas de DNA^{1,4,9}.

O Sistema Automatizado MB/BacT™ para o isolamento de micobactérias e a sonda Accuprobe™ para a identificação das espécies, foram implantados nos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz de Campinas, Ribeirão Preto e São José do Rio Preto, pelo Programa Estadual de DST/AIDS, para aprimorar e agilizar o diagnóstico da tuberculose em pacientes com resultado positivo no teste HIV e que foram atendidos nessas regiões que apresentam grande número de casos de co-infecção TB/HIV.

O objetivo desse estudo foi comparar a taxa de isolamento e o tempo de detecção de micobactérias em espécimes clínicos de pacientes com resultado positivo no teste HIV, analisando os resultados obtidos com o sistema MB/BacT™

e o método convencional com meio de Löwenstein-Jensen (LJ).

MATERIALE MÉTODOS

Amostras

Foram processados pelos dois métodos 791 espécimes clínicos de origem pulmonar, coletados de pacientes com resultado positivo nos testes sorológicos para HIV, atendidos em Unidades Básicas de Saúde e Hospitais de Campinas, Ribeirão Preto e São José do Rio Preto entre março a novembro de 2000, conforme protocolo de implantação do sistema MB/BacT™, definido pela Coordenação do Programa Estadual de DST/AIDS.

Baciloscopia

Os esfregaços feitos a partir dos espécimes clínicos, foram corados pelo Método de Ziehl-Neelsen e observados ao microscópio óptico comum^{3,6}.

Isolamento

Os espécimes biológicos após descontaminação com N-acetil-L cisteína/NaOH foram semeados em meio de Löwenstein-Jensen (LJ), LJ acrescido de ácido p-nitrobenzóico (LJ-PNB) e Middlebrook 7H9 do sistema MB/BacT™. Os frascos de LJ e LJ-PNB foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C e os frascos de Middlebrook 7H9 foram incubados no sistema MB/BacT™, que consiste de estufa bacteriológica com monitoramento contínuo de crescimento. As culturas positivas, foram confirmadas quanto à presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), pela observação de esfregaços corados pelo método de Ziehl-Neelsen^{3,6}. As culturas do sistema MB/BacT™ onde se detectou presença de microrganismos contaminantes ou presença de BAAR e microrganismos contaminantes foram descontaminadas pelo método de Petroff modificado³ utilizando NaOH 4,0% e semeadas em novo meio de cultura do sistema MB/BacT™.

Identificação

As espécies dos complexos *M. tuberculosis* (MT) e *M. avium* (MAC) foram identificadas pelo sistema DNA Accuprobe™. O crescimento em meio de LJ-PNB foi usado para a classificação presuntiva rápida das demais espécies, que foram posteriormente identificadas com os métodos fenotípicos^{2,3,6}.

RESULTADOS

Com o sistema MB/BacT™ foram detectadas 237 (30,0%) culturas positivas para micobactérias sendo que 135 (17,1%) apresentaram resultado positivo na baciloscopia direta e 102 (12,9%) apresentaram resultado negativo (Tabela 1). Com o meio de LJ foram detectadas 155 (19,0%) culturas positivas para micobactérias.

O tempo médio de detecção das micobactérias no sistema MB/BacT™ foi 10,7 dias (2,5 a 60 dias) e no meio LJ foi

Tabela 1. Isolamento de micobactérias a partir de espécimes clínicos nos meios de Löwenstein Jensen e Middlebrook 7H9 do sistema MB/BacT™.

MEIOS DE CULTURA	TOTAL DE AMOSTRAS	RESULTADOS		
		POSITIVO (%)	NEGATIVO (%)	CONTAMINADO (%)
Middlebrook 7H9 do MB/BacT™	791	237 (30,0%)	486 (61,4%)	68 (8,6%)
Löwenstein-Jensen	791	155 (19,0%)	420 (53,1%)	216 (27,3%)

28 dias (15 a 42 dias).

A identificação fenotípica ou genotípica das espécies foi inconclusiva em 22 culturas positivas. Nas demais os resultados obtidos foram: 136 *M.tuberculosis*, 43 complexo *M. avium*, 9 *M. chelonae*, 12 *M. fortuitum*, 1 *M. kansasii*, 1 *M. terrae*, 7 *M. gordonae*, 1 *M. peregrinum*, 1 micobactéria de crescimento lento escotocromógena e 4 micobactérias de crescimento lento acromógenas.

DISCUSSÃO

A detecção e identificação rápida das micobactérias em amostras biológicas é importante para o início de um tratamento adequado do paciente com tuberculose pulmonar ou micobacteriose.

Essa agilização é decisiva para o início de uma intervenção adequada para os pacientes com co-infecção TB-HIV que apresentam grande porcentagem de amostras paucibacilares. Além disso, nesses pacientes é mais frequente a ocorrência de doença causada por micobactérias não tuberculosas.

Nesse estudo, avaliou-se o desempenho do sistema MB/BacT™ em comparação com o isolamento em meio de Löwenstein-Jensen (LJ). O tempo médio de detecção das micobactérias foi menor nesse sistema quando comparado com o meio LJ. No caso de amostras paucibacilares, o tempo médio de crescimento no MB/BacT™ foi de 10 dias enquanto que no LJ foi de 28 dias. Segundo a OMS¹⁵ uma das desvantagens da cultura em meio de LJ, principalmente quando os espécimes biológicos são paucibacilares, é a detecção tardia do crescimento das micobactérias o que demonstra a vantagem da utilização do sistema automatizado.

Além disso, a taxa de detecção de micobactérias com o sistema MB/BacT™ foi 11,2% maior do que com o método tradicional de isolamento (LJ).

Com o sistema MB/BacT™ foram detectadas 237 culturas positivas para micobactérias e com o meio de LJ foram detectadas

65,4% dessas culturas. Não foi observado crescimento de micobactérias apenas no LJ.

A porcentagem de detecção com o LJ foi próxima à dos estudos de Piersimoni et al.⁸ e de Alcaide et al.¹ que relataram respectivamente 64,2% e 70% de positividade com os meios a base de ovos. Porém, bem menor que o observado por Rohner et al.¹¹ e Manterola et al.⁷ que relataram 79,5% e 92,5% respectivamente. Nestes estudos, com maiores taxas de crescimento em meio sólido, observamos que foram usados dois tipos de meio para o isolamento de micobactérias: LJ e Coletsos ou Stonebrink e Coletsos, possivelmente por essa razão, a porcentagem de positividade em relação à do sistema automatizado foi maior.

Em relação à porcentagem de contaminação das culturas por outros microrganismos foi inicialmente observado 24,0% para o meio MB/BacT™ e 27,3% para o LJ. A menor porcentagem de contaminação no sistema MB/BacT™ pode ser explicada pelo uso de antibiótico no meio de cultura desse sistema.

Neste estudo foi utilizado o método de N-acetil-L cisteína/NaOH, indicado pelo fornecedor do Sistema MB/BacT™, para descontaminação dos espécimes biológicos. Esse método por ser menos drástico possibilita melhor recuperação das micobactérias em cultura. Porém, por essa mesma razão, uma contaminação excessiva pode ocorrer em determinados casos¹⁵. Os resultados obtidos sugerem a realização de estudos em paralelo deste método com o de Petroff³, mais usado no Brasil, para comparar a taxa de contaminação e de positividade com ambos e adequar o uso do sistema MB/BacT™ à nossa realidade.

As culturas no MB/BacT™ em que se detectou presença de microrganismos contaminantes ou presença de BAAR e microrganismos contaminantes foram retratadas, o que possibilitou o aumento de 4,7% de culturas positivas (Figura 1). Após o retratamento, a porcentagem de contaminação no MB/BacT™ foi de 8,6%.

O retratamento das culturas do meio LJ não foi possível e esse fato pode ter influenciado o total de positividade com esse meio. O crescimento de determinados microrganismos no meio de LJ geralmente o liquefaz ou estes se espalham por toda a sua superfície em 24 horas, impossibilitando o crescimento

concomitante das micobactérias. Essas culturas são descartadas e esta é outra desvantagem citada pela OMS quanto à utilização desse meio¹⁵.

A identificação rápida e precisa das espécies mais freqüentes pertencentes aos complexos *M. tuberculosis* e *M. avium*, foi realizada pelo sistema molecular AccuProbe™ em 77,0% e 91,9% das culturas respectivamente. Quando os testes foram negativos para essas espécies ou no caso de solicitação do perfil de susceptibilidade às drogas, as culturas foram encaminhadas ao Laboratório Central do Instituto Adolfo Lutz para identificação com os testes fenotípicos.

O sistema MB/BacT™, com detecção automatizada do crescimento bacteriano, fornece um resultado mais rápido e sensível que o método tradicional que utiliza meio de cultura sólido à base de ovos. Este sistema acompanhado da identificação molecular poderá ser uma ferramenta útil para o Programa de Controle de Tuberculose, agilizando a identificação das espécies mais freqüentes e possibilitando uma intervenção rápida no tratamento dos pacientes com co-infecção HIV/TB.

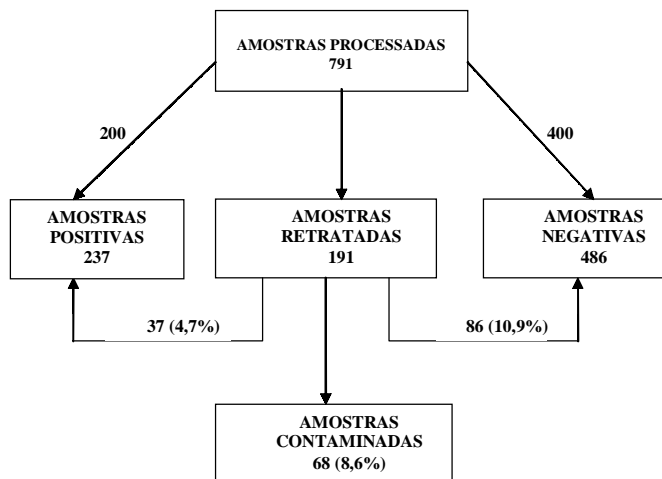


Figura 1. Contribuição do sistema MB/BacT™ na detecção de micobactérias em espécimes biológicos – Estado de São Paulo, 2000.

RIALA6/964

Aily, D.C.G. et al. - Mycobacteria isolation in clinical specimens using the MB/BacT™ system. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 62(3): 233 - 237, 2003.

ABSTRACT. The increasing incidence of tuberculosis and other mycobacterial diseases has made it essential for laboratories to quickly detect and identify mycobacteria. A total of 791 clinical specimens were collected from patients who were HIV positive, between March and December 2000. The MB/BacT™ system has detected 30.0% of mycobacterial isolates, while 18.8% were detected by Löwenstein-Jensen medium. The automated MB/BacT™ system was more sensitive and rapid than the traditional method for mycobacterial recovery. The MB/BacT™ system plus a DNA AccuProbe identification method could be a useful tool for the TB Control Program in rapid diagnosing TB cases among HIV positive patients.

KEY WORDS. *Mycobacterium tuberculosis*; diagnostic; infection TB/HIV; MB/BacT™.

REFERÊNCIAS

1. Alcaide, F. et al. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/BacT systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe. *J. Clin. Microbiol.*, 38 (1): 398-401, 2000.
2. Badak, F. Z. et al. Use of nucleic acid probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from MB/BacT bottles. *J. Clin. Microbiol.*, 37 (5): 1602-1605, 1999.
3. 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.
4. Brunello, F.; Favari, F.; Fontana, R. Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria from various clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 37 (4): 1206-1209, 1999.
5. Conville, P. S. & Witebsky, F. G. Inter-bottle transfer of mycobacteria by the BACTEC 460. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 12: 401-405, 1989.
6. Kent, P. T. & Kubica, G. P. **Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory**. Atlanta, US Department of Health and Human Services, 1985.
7. Manterola, J.M. 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.*, 17:773-77, 1998.
8. Piersimoni et al. Comparison of MBBacT Alert 3D System with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: A multicenter study. *J. Clin. Microbiol.*, 39:651-57, 2001.
9. Roberts G.D.; Bottger E.C.; Stockman L. Methods for the rapid identification of mycobacterial species. *Clinics Lab. Med.*, 16(3):603-13, 1996.
10. Roggenkamp, A. et al. Comparison of MB/BacT and the BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria in a routine diagnostic laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 37 (11): 3711-3712, 1999.
11. 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.*, 35(12):3127-3131, 1997.
12. Rosemberg, J. Tuberculose Panorama Global, óbices para o seu controle. Secretaria da Saúde do Estado do Ceará – 1999.
13. São Paulo, Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. (**Informe Técnico – Campanha Estadual de Busca de Casos de Tuberculose**). Alerta TB/1998.
14. Wolinsky, E. Conventional diagnostic methods for tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.*, 19: 396-401, 1994.
15. World Health Organization. (**Laboratory Services in Tuberculosis Control**.) Part III: Culture. Geneva 1998.

Recebido em 07/08/2003 ; Aprovado em 11/12/2003