

Microcultivo en medio bifásico con laminilla siliconada para el aislamiento de *Mycobacteriae*¹

Héctor Shibayama,² Felipe de Jesús Galván³
y Cudberto Contreras⁴

El presente estudio describe el uso de laminillas siliconadas en tres medios bifásicos para el aislamiento de micobacterias: medio de Löwenstein-Jensen-Holm (sólido) y medio de Sula (líquido); agar 7H10 de Middlebrook (sólido) y medio de Sula; y medio de Löwenstein y solución amortiguadora a base de fosfatos. Se estudiaron 540 muestras de esputo de 180 pacientes empleados en el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado en México, DF, con signos radiológicos de tuberculosis pulmonar o con enfermedad confirmada. De las muestras examinadas, 71 (13,14%) mostraron crecimiento bacilar macroscópico en los tres medios de cultivo y los típicos cordones serpentinos microscópicos en las laminillas siliconadas en la segunda, tercera o cuarta semana de incubación. Las 469 muestras restantes continuaron sin mostrar crecimiento macroscópico hasta el final del período de incubación convencional, que fue de 8 semanas. Sin embargo, 77 (14,25%) de estas muestras revelaron bajo el microscopio bacilos ácidoalcoholresistentes en cantidades variables y en diferentes formaciones. Con el microcultivo el número de resultados positivos aumentó de 71 (13,14%) a 148 (27,40%). Las diferencias entre los resultados macroscópicos y microscópicos en términos de crecimiento bacilar fueron significativas cuando se aplicó la prueba Q de Cochran.

La sensibilidad del procedimiento aquí descrito, su bajo costo y su sencillez lo colocan al alcance de los laboratorios más pequeños en países en desarrollo, donde las técnicas de identificación ultramodernas, como la prueba en cadena de la polimerasa y la radiometría automatizada, están todavía muy lejos de aplicarse.

La tuberculosis es un grave problema de salud pública que ha aumentado notablemente en los últimos años en países industrializados y en desarrollo, según indican las tasas de morbilidad y mortalidad (1, 2). La detección del bacilo tuberculoso por examen microscópico o cultivo sigue siendo fundamental para el diagnóstico y control de la en-

fermedad. Mediante la técnica molecular denominada reacción en cadena de la polimerasa (RCP), se ha logrado amplificar secuencias específicas de los ácidos nucleicos del bacilo, aunque esté presente en cantidades muy pequeñas (3, 4). La radiometría automatizada (BACTEC) también ha mostrado gran utilidad (5, 6). Sin embargo, estas técnicas son altamente complejas y costosas o requieren material radiactivo, y por lo tanto están muy lejos de ser utilizadas en las áreas rurales de países en desarrollo. Recientemente se ha estudiado el crecimiento de microcolonias micobacterianas antes de que sean visibles macroscópicamente en medios sólidos (7). Aunque se han descrito varias técnicas de microcultivo en portaobjetos o laminillas (8-10), ninguna ha sido de uso general debido al elevado grado de contaminación observado y a la tendencia de los bacilos a desprenderse de la laminilla, fenómeno que aumenta el riesgo de transmisión. Por otro lado, hay una téc-

¹ Se publica en el *Bulletin of the Pan American Health Organization*, Vol. 30, No. 3, 1996, con el título "Mycobacteriae isolation using silicone-coated slide microculture in biphasic medium" El trabajo de laboratorio se realizó en 1975-1976 y dio lugar a una tesis de licenciatura. Sin embargo, nunca se publicó por haberse interrumpido el Programa de Lucha Antituberculosa del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, del que se obtuvieron los datos.

² Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas, México DF, México. Dirección postal: Carpio No. 470, Colonia Santo Tomás, México DF 11340. Toda correspondencia debe dirigirse a este autor.

³ Universidad Autónoma de Puebla, Departamento de Microbiología, Puebla, México.

⁴ Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, México, DF, México.

rica de microcultivo en la que *Mycobacterium tuberculosis* se adhiere fuertemente a la superficie hidrofóbica del silicón en el tubo de ensayo (11). Mediante una modificación de esta técnica basada en el uso de laminillas de vidrio tratadas con silicón se ha obtenido, a partir de suspensiones de cultivos de *M. tuberculosis*, un crecimiento bacilar microscópico cuya cantidad depende de la concentración del inóculo. Con este método se pueden ver colonias pequeñas macroscópicamente después de 5 a 15 días, mientras que con el medio sólido esto no sucede hasta después de 10 a 40 días (12).

Aprovechando las ventajas prácticas del medio bifásico para hemocultivos desarrollado por Ruiz-Castañeda (13) y la sensibilidad de las técnicas de microcultivo (12) para *M. tuberculosis*, ensayamos una modificación de ambos métodos para aislar *Mycobacteriae* de muestras clínicas introduciendo una laminilla siliconada en el frasco del cultivo. A fin de lograr el medio bifásico se mezclaron los medios sólidos de Löwenstein-Jensen-Holm y Agar 7H10 de Middlebrook (14) con el medio líquido de Sula (15) y solución amortiguadora a base de fosfatos. Los objetivos del estudio fueron desarrollar una técnica sencilla, práctica, sensible y barata para el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis y comparar la sensibilidad del microcultivo en laminillas siliconadas con el crecimiento macroscópico en medio bifásico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para preparar las laminillas según la técnica propuesta por Higashi et al. (12), portaobjetos de 26 mm × 76 mm se cortaron longitudinalmente en tres partes con un lápiz con punta de diamante. Se modificó la técnica original mediante la sustitución de las gradillas de aluminio por un vaso de precipitados de 500 mL durante todo el procedimiento. Las laminillas fueron desgrasadas con mezcla crómica (ácido sulfúrico y dicromato de potasio) durante 12 horas. Posteriormente fueron lavadas con agua de pila a discreción, enjuagadas con agua destilada y secadas a temperatura ambiente, antes de ser lavadas

con éter de petróleo y secadas nuevamente a la temperatura ambiente. Las laminillas fueron sumergidas en una solución al 2% (V/V) de dimetil silicón (Watson-Philips) en tetracloruro de carbono. Después de 15 min se les dejó escurrir el solvente y se pusieron a evaporar a temperatura ambiente. El vaso de los precipitados con las laminillas se horneó a 300 °C por una hora para estabilizar la película de silicón en la laminilla.

Se envasaron 5 mL de los medios de Löwenstein-Jensen-Holm y agar 7H10 de Middlebrook (14) en botellas de tipo McCartney de 60 mL y posteriormente se sometieron a pruebas de esterilidad.

Se estudió un total de 540 muestras de esputo provenientes de 180 pacientes empleados en el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) en México, DF, con sospecha de tuberculosis pulmonar. La expectoración fue provocada por medio de un aerosol salino emitido por un nebulizador ultrasónico (De Vilbiss, Co.) (16). Un volumen de 5 mL de esputo de cada paciente fue tratado durante 20 min con un volumen igual del reactivo de Hanks (17) mezclado con N-acetil-L-cisteína al 0,5% (18). Después de neutralizar las muestras con ácido clorhídrico al 25%, cada una fue centrifugada a 2800 rpm por 20 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento resultante se suspendió en 5 mL del medio líquido de Sula o de solución amortiguadora a base de fosfatos a un pH de 6,8, que sirvió de control. Todo el sedimento suspendido fue transferido a las botellas y a cada cultivo se le introdujo una laminilla siliconada esterilizada, obteniéndose de esa forma el sistema de microcultivo en medio bifásico.

La distribución de muestras clínicas en los distintos medios de cultivo fue la siguiente: 194 en una mezcla de Löwenstein y Sula; 132 en una mezcla de Middlebrook y Sula; y 214 en una mezcla de Löwenstein y solución amortiguadora a base de fosfatos. Los cultivos fueron incubados a 37 °C y revisados semanalmente durante 8 semanas. Tan pronto se detectó un crecimiento macroscópico mínimo, las laminillas siliconadas fueron retiradas del medio bifásico, colocadas en tubos de ensayo y esterilizadas con fenol al 5%

durante 10 min o en autoclave a 121 °C. Posteriormente fueron coloreadas por la técnica de Kinyoun para el examen microscópico. Las muestras que no presentaron crecimiento bacilar macroscópico ni en el medio sólido ni en la laminilla inmersa en el medio bifásico se incubaron hasta 8 semanas, al cabo de las cuales todas las laminillas siliconadas se esterilizaron y colorearon para ser observadas al microscopio.

El análisis estadístico del estudio se realizó con la prueba no paramétrica *Q* de Cochran para *k* muestras relacionadas. Para efectuar la prueba, se partió de la premisa de que todas las muestras positivas por el método tradicional serían positivas con la nueva técnica. La prueba estadística fue aplicada a cada muestra por separado con un riesgo alfa ($P = 0,05$). Para evaluar los resultados obtenidos con el medio bifásico se realizó un segundo análisis estadístico con la prueba de ji cuadrado para muestras independientes. Se evaluaron primero los resultados del cultivo en el medio sólido y después los del microcultivo en la laminilla siliconada (19).

RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestran los resultados del aislamiento primario de micobacterias por el método de microcultivo en medio bifásico con laminilla siliconada. Se observó crecimiento bacteriano macroscópico, tanto en la fase sólida como en la líquida, en 71 de las 540 muestras de esputo (figura 1) en la segunda, tercera o cuarta semana de incuba-

ción. El mismo número de laminillas siliconadas mostraron crecimiento bacilar en un lapso de 10 a 28 días. La revisión microscópica de estas laminillas después de la tinción con la técnica de Kinyoun mostró los típicos cordones serpentinos (figura 2) laxos y apretados, con bacilos dispuestos paralelamente a lo largo de su eje longitudinal, y un crecimiento más abundante en la parte de la laminilla próxima a la superficie del medio líquido. Este último se adhirió firmemente a cada laminilla y no se desprendió por acción del fenol, la autoclave, o la tinción de Kinyoun.

En las 469 muestras restantes no hubo crecimiento macroscópico en los medios bifásicos después de 8 semanas de incubación, al cabo de las cuales el cultivo suele considerarse negativo. Sin embargo, después de la tinción 77 de las laminillas correspondientes a estas 469 muestras revelaron bacilos ácidoalcoholresistentes en diferentes cantidades y formaciones, desde bacilos aislados hasta microcolonias verdaderas (figura 3), pero sin llegar a formar cordones serpentinos. De las 77 laminillas siliconadas que mostraron crecimiento bacilar, 36 habían estado inmersas en el medio bifásico de Löwenstein-Sula, 27 en el de Middlebrook-Sula y 14 en el de Löwenstein-solución amortiguadora a base de fosfatos. En los primeros 28 días de incubación no se observaron diferencias en el crecimiento macro o microscópico ni diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos con los tres medios bifásicos. Sin embargo, al final del período de incubación convencional de 8 semanas se

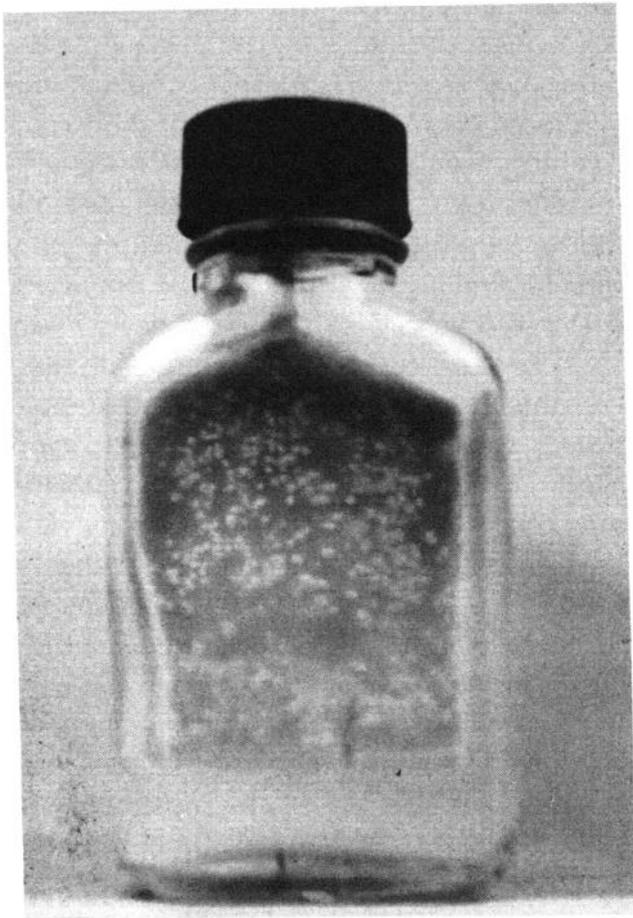
CUADRO 1. Número y porcentaje de muestras de esputo cultivadas en tres medios bifásicos con y sin crecimiento macro y microscópico de *Mycobacteriae* al cabo de 2 a 4 semanas y de 8 semanas de cultivo

Medio de cultivo	Crecimiento micro y macroscópico			Crecimiento microscópico		
	2 a 4 semanas			8 semanas		
	<i>n</i>	No.*	%*	<i>n</i>	No.	%
Löwenstein-Sula	194	27	13,9	167	36	13,1
Middlebrook-Sula	132	19	14,3	113	27	23,9
Löwenstein-amortiguador de fosfatos	214	25	11,6	189	14†	7,6†
Total	540	71	13,1	469	77	17,3

* No hubo diferencia significativa entre los resultados obtenidos con los tres medios de cultivo ($P = 0,71$).

† Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre este resultado y los resultados obtenidos con los otros medios de cultivo

FIGURA 1: Macrocolonias de *Mycobacterium tuberculosis* visibles en las botellas con medio bifásico y laminillas siliconadas



observó un aumento significativo de la sensibilidad ($P > \text{de } 0,001$) con la técnica de observación microscópica. Cuando se compararon los resultados con los distintos medios de cultivo bifásicos, no se observó ninguna diferencia significativa entre los medios de Löwenstein-Sula y Middlebrook-Sula ($P > 0,68$), pero sí entre cada uno de estos y el medio de Löwenstein-solución amortiguadora a base de fosfatos ($P > 0,001$). En el medio de Sula las bacterias proliferan libremente, mientras que en la solución amortiguadora a base de fosfatos simple no proliferan, a menos que el contacto prolongado con el medio sólido disuelva o difunda nutrientes que propicien cierto grado de crecimiento bacteriano.

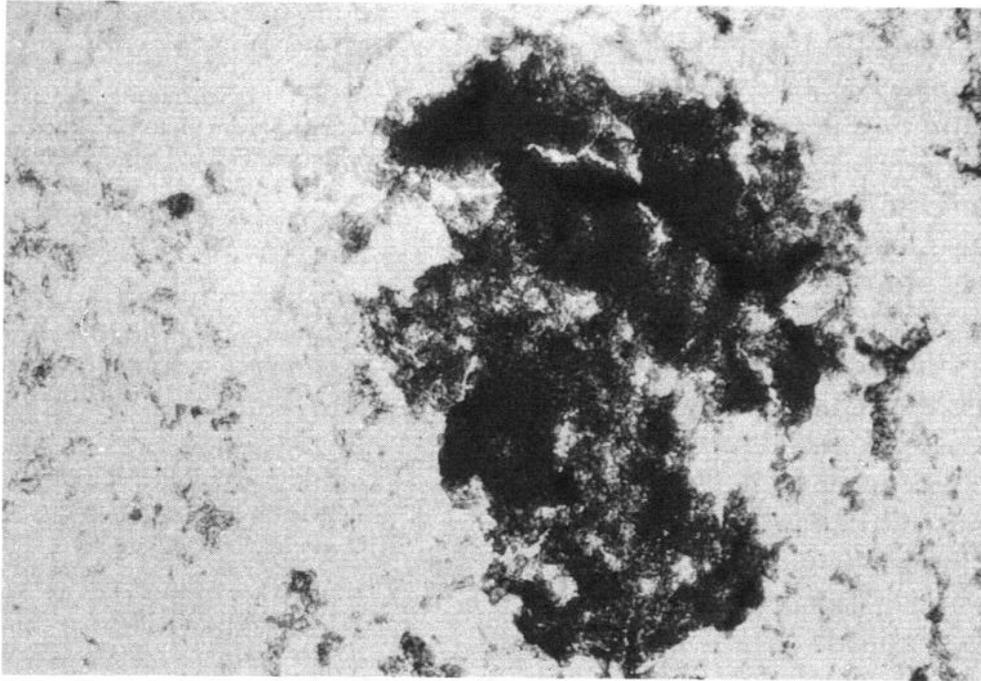
DISCUSIÓN

El recrudescimiento de la tuberculosis en años recientes y los escasos recursos económicos destinados a su control en muchos países en desarrollo nos han llevado a investigar la elaboración de técnicas simples para aumentar la sensibilidad del aislamiento de micobacterias. Los resultados de este estudio demuestran que es posible incrementar el

FIGURA 2: Cordones serpentinos microscópicos formados por el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en laminillas siliconadas cultivadas en medio bifásico



FIGURA 3: Colonias de *Mycobacterium tuberculosis* cultivado en laminillas siliconadas en medio bifásico



aislamiento de bacilos al final del período de incubación convencional, que es de 8 semanas. No fue un objetivo del estudio determinar si se puede hacer una identificación temprana de *M. tuberculosis*, aunque se trata de un aspecto importante que merece atención. Los estudios recientes se han concentrado en la detección de microcolonias directamente en el medio sólido, antes de que sean observables macroscópicamente (7, 20).

El medio más usado para cultivar *Mycobacteriae* es el de Löwenstein en tubo, que es a base de huevo. La eficacia del medio líquido para hacer el aislamiento ha sido descrita por Sula y es similar a la del medio de Löwenstein (15, 21). Consideramos que nuestra técnica permite un aumento de la sensibilidad en función de la cantidad de inóculo usada. Con la técnica habitual el inóculo es de 0,1 mL; en nuestro caso todo el sedimento obtenido a partir de la muestra digerida y descontaminada se sembró en 5 mL de medio líquido. La posibilidad de observar bacilos viables es 50 veces mayor con nuestra técnica. Es posible, además, que con ella se diluyan algunas sustancias tóxicas en la muestra, como los antifímicos, lo cual favorece un mejor crecimiento. El medio bifásico que sirvió de testigo, compuesto del medio sólido de Löwenstein y

de solución amortiguadora a base de fosfatos, propició cierto crecimiento de bacilos, pero no tanto como las mezclas de Löwenstein-Sula y Middlebrook-Sula. Estas últimas pueden utilizarse indistintamente, ya que ambas satisfacen los requerimientos nutricionales básicos del bacilo, a diferencia de la mezcla de Löwenstein con solución amortiguadora de fosfatos. Se usó este último medio bifásico a manera de control para evitar la preparación del medio de Sula, que es más difícil de mezclar y más costoso.

Debido a su pared rica en lípidos, *Mycobacteriae* tiene una tendencia a desplazarse en ambientes hidrofóbicos (11, 12, 22) y la superficie siliconada de la laminilla no ha sido una excepción. Este trabajo explora el cultivo bifásico en muestras clínicas para el aislamiento de *M. tuberculosis* con buenos resultados. Por consiguiente, comprueba y reafirma los elegantes y pioneros estudios de Fisher (11) e Higashi et al. (12) con tubos de ensayo siliconados y laminillas siliconadas, respectivamente, utilizando medios líquidos y cultivos puros de *M. tuberculosis*.

La técnica de laminilla siliconada también nos ha dado buenos resultados para el microcultivo de dermatofitos (23). Aunque en los últimos años las técnicas de BACTEC y

RCP, que tienen alta sensibilidad y especificidad, se han aplicado al diagnóstico de *Mycobacteriae*, su alto costo en equipo y reactivos por un lado, y por el otro el uso de isótopos radiactivos con el BACTEC y la necesidad de tener laboratorios especializados y personal entrenado en tecnología molecular, hacen que sea prácticamente imposible aplicar estas técnicas en países en desarrollo. En cambio, el microcultivo aquí descrito tiene un costo aproximado de US\$ 2,00 por muestra. En vista de que los materiales necesarios para aplicar esta técnica existen en prácticamente todos los laboratorios, se recomienda el uso de medios de cultivo bifásicos con laminillas siliconadas para el aislamiento de *Mycobacteriae* a partir de muestras clínicas.

En resumen, la técnica de microcultivo en laminilla siliconada es fácil, económica y práctica y reduce el riesgo de contagio durante la manipulación de las muestras. Tiene la ventaja adicional de aceptar un mayor volumen de inóculo y de favorecer el crecimiento bacteriano. Esta técnica puede ser especialmente útil en laboratorios pequeños de países en desarrollo.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo se llevó a cabo en el antiguo Centro Médico de Enfermedades del Aparato Respiratorio del ISSSTE y está dedicado a la memoria del doctor Maximiliano Ruiz-Castañeda en el tercer aniversario de su fallecimiento. Extendemos nuestro agradecimiento al equipo de trabajo de la Clínica Ermita, ISSSTE; a Leticia Núñez Ojeda, Cristina Medina, Leopoldo Hernández y Manuel Gómez P., y al doctor Francisco J. Alvarado Alemán por la valiosa ayuda que nos brindaron en la revisión del manuscrito.

REFERENCIAS

- Sudre P, Ten Dam G, Chan C, Kochi A. Tuberculosis in the present time: a global overview of the tuberculosis situation. Geneva: World Health Organization; 1991. (Document WHO/TUB/91.158).
- Hamburg MA, Frieden TR. Tuberculosis transmission in the 1990s. *N Engl J Med* 1994;330:1750-1751.
- Noordhoek GT, Kolk AHJ, Bjune G, Catty D, Dale JW, Fine PEM, Godfrey-Fausset P, Sang-Nae C, Shinnik T, Svenson SB, Wilson S, van Embden JDA. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol* 1994;32:277-284.
- Kolk AHJ, Schuitema ARJ, Kuijper S, van Leeuwen J, Hermans PWM, van Embden JDA, Harstkeerl RA. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and nonradioactive detection system. *J Clin Microbiol* 1992;30:2567-2575.
- Middlebrook G, Reggiardo Z, Tigerl WD. Automatic radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. *Am Rev Respir Dis* 1977;115:1066-1069.
- Park CH, Hixon DL, Ferguson CB, Hull SL, Rishin CC, Cook BC. Rapid recovery of mycobacteria from clinical specimens using automated radiometric technic. *Am J Clin Pathol* 1984;81:341-345.
- Welch DF, Guruswamy AP, Sides SJ, Shaw CH, Gilchrist MJR. Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method. *J Clin Microbiol* 1994;31:2178-2184.
- Rosenberg KS. Slide culture method for tubercle bacilli. *Lancet* 1943;1:615.
- Berry JW, Lowry H. A slide culture method for the early detection and observation of growth of the tubercle bacillus. *Am Rev Tuberc* 1943;60:51-553.
- Price DM. Sputum film cultures of tubercle bacilli: a method for the early observation of growth. *J Pathol Bacteriol* 1941;53:327-331.
- Fisher MW. The growth of tubercle bacilli in silicone coated glass tubes. *J Bacteriol* 1954;67:613-617.
- Higashi K, Tsukuma S, Naito M. Silicone-coated slide culture methods for tubercle bacilli. *Am Rev Resp Dis* 1962;85:392-397.
- Ruiz Castañeda MR. A practical method for routine blood cultures in brucellosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1947;64:114.
- Middlebrook G, Conh ML. Bacteriology of tuberculosis, laboratory methods. *Am J Public Health* 1958;48:844-858.
- Sula L, Sundaresan TK. WHO Cooperative studies on a simple culture technique for the isolation of mycobacteria. 2. Comparison of the efficacy of lyophilized liquid medium with that of Löwenstein-Jensen medium. *Bull WHO* 1963;29:607-625.
- Lillehai JP. Sputum induction with aerosol inhalation for the diagnosis of tuberculosis. *Am Rev Resp Dis* 1961;84:276-278.
- Hanks HT. *A syllabus of laboratory examinations in clinical diagnosis*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press; 1956:366-367.
- Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-

acetyl, L-cysteine sodium hydroxide, for the isolation of mycobacteria. *Am Rev Resp Dis* 1963;87:775-779.

19. Siegel S. *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. México, DF: Trillas; 1994:120-203.
20. Runyon EH. Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. *Am J Clin Pathol* 1970;54:578-586.
21. Salazar-Alegre O. Estudio comparativo de las posibilidades de los medios Löwenstein-Jensen y

liofilizado reconstituido de Sula para el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis*. *Bol Of Sanit Panam* 1967;81:13-16.

22. Palen MI, Wong HY, Leiston E. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by pepsin digestion and interface concentration with pentane. *Am Rev Tuberc* 1957;75:148-152.
23. Shibayama-Hernández H, Contreras-Pérez C, Collazo-Ponce A, Alvarado-Alemán FJ. Microcultivo de dermatofitos en laminillas siliconadas. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1994;51:403-406.

Manuscrito recibido el 18 de enero de 1995. Tras ser aceptado condicionalmente y revisado por los autores, se aceptó definitivamente para publicación en el *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* y en el *Bulletin of the Pan American Health Organization* el 31 de octubre de 1995.

ABSTRACT

Mycobacteriae isolation using silicone-coated slide microculture in biphasic medium

This study describes isolation of mycobacteria through the use of silicone-coated slides in three biphasic media: Löwenstein-Jensen-Holm (solid) and Sula (liquid) media; agar Middlebrook 7H10 (solid) and Sula; and Löwenstein medium and phosphate buffer solution. Sputum samples (540) were studied from 180 patients who were employed by the Institute of Security and Social Services for Government Workers in Mexico City and who showed radiological evidence of pulmonary tuberculosis or had a confirmed diagnosis of the disease. Of the samples studied, 71 (13.14%) showed macroscopic colonies in the three culture media as

well as the typical microscopic serpentine growth pattern on silicone-coated slides during the second, third, and fourth weeks of incubation. In the other 469 samples, macroscopic growth was absent throughout the conventional incubation period (8 weeks). However, under the microscope 77 (14.25%) of these samples showed acid-fast bacilli in various quantities and different patterns. Thus, microculture raised the number of positive samples from 71 (13.14%) to 148 (27.40%). The difference between the macroscopic and microscopic results in terms of growth of the bacilli was significant according to Cochran's Q test.

The sensitivity of the procedure described herein, its low cost, and its simplicity puts it within the reach of even the smallest laboratories in developing countries, where utilization of the most modern identification techniques, such as polymerase chain reaction and automated radiometry, is not yet practicable.