

# POSIBILIDADES DE SUSTITUIR EL MEDIO DE LÖWENSTEIN-JENSEN POR EL LIOFILIZADO DE SULA EN LOS LABORATORIOS DE LUCHA ANTITUBERCULOSA

Dr. Juan B. Scocozza,<sup>1</sup> Beatriz Salinas<sup>2</sup> y Elsa P. de Hoet<sup>3</sup>

*Razones técnicas y administrativas aconsejan la utilización, en los laboratorios de lucha antituberculosa, de un medio de cultivo de composición química definida, de larga duración y que pueda ser preparado en cantidades industriales, y distribuido, a bajo costo, en escala nacional.*

## Introducción

Numerosos trabajos realizados con medio liofilizado y reconstituido de Sula han mostrado su eficacia como medio para el aislamiento del *Mycobacterium tuberculosis* (1-3).

La posibilidad de utilizar el medio liofilizado de Sula en laboratorios de recursos limitados podría solucionar el serio problema que representa en la mayoría de los países latinoamericanos la organización y coordinación de un adecuado sistema de envío de esputos a los laboratorios, ya que son escasos los que disponen de facilidades para realizar cultivos y pruebas de sensibilidad a las drogas antituberculosas.

Algunas pocas experiencias realizadas en países latinoamericanos (4-7) muestran que el medio liofilizado reconstituido de Sula es tan sensible como el Löwenstein-Jensen generalmente utilizado. Entre las principales ventajas de la utilización de aquel medio, se debe señalar que, en estado liofilizado, puede conservarse un año a temperatura ambiente y dos años en refrigeración, lo cual hace posible la preparación industrial del mismo, y que la facilidad de reconstitución permite su utilización en laboratorios de

recursos modestos. El ahorro de tiempo que suponen la reconstitución del medio y el proceso de lavado y recuperación de los tubos de cultivo es factor de mayor rendimiento en los laboratorios en la lucha antituberculosa.

## Experiencia I

Se trataba de comparar el grado de sensibilidad del medio sólido de Löwenstein-Jensen y el medio liofilizado de Sula.

Se practicó con cinco pacientes que tenían baciloscopia positiva. Los esputos, luego de haber sido homogeneizados y concentrados, fueron sembrados, primero sin diluir, luego en las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ .

Por cada uno de los cuatro inóculos se sembraron cinco tubos en medio de Löwenstein-Jensen y cinco tubos en medio liofilizado de Sula.

En el primer inóculo, sin diluir, se procedió así: se recolectaron esputos de cinco pacientes con baciloscopia positiva; se recogieron tres muestras por paciente en tres días sucesivos; las muestras de cada paciente fueron mezcladas y agitadas mecánicamente durante cinco minutos; se trataron 5 ml de esputo con 5 ml de fosfato trisódico al 10% durante 24 horas a 37°C; se neutralizó con ácido clorhídrico y rojo de fenol; luego se centrifugó a 3,000 rpm durante 30 minutos; el líquido sobrenadante se descartó

<sup>1</sup> Jefe de Laboratorio del Centro Nacional de Lucha Antituberculosa, Recreo, Santa Fe, Argentina.

<sup>2</sup> Estadística del Centro Nacional de Lucha Antituberculosa, Recreo.

<sup>3</sup> Técnica del Laboratorio del Centro Nacional de Lucha Antituberculosa, Recreo.



CUADRO 2—Grado de sensibilidad del medio de Löwenstein-Jensen y del medio liofilizado (líquido) de Sula. Resultados obtenidos tres semanas después de la inoculación.

Paciente	Dilución	Resultados en medio liofilizado					Resultados en medio de Löwenstein-Jensen					
		+	++	+++	++++	+	++	+++	++++	+	++	+++
1	Dilución madre	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
	10 <sup>-4</sup>	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
	10 <sup>-5</sup>	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
	10 <sup>-6</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Dilución madre	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10 <sup>-4</sup>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10 <sup>-5</sup>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10 <sup>-6</sup>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	6	+	+	+
3	Dilución madre	++	+	++	++	++	+	+	+	+	++	++
	10 <sup>-4</sup>	++	+	++	++	++	+	+	+	+	+	++
	10 <sup>-5</sup>	+	0	0	4	5	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-6</sup>	0	0	0	4	5	0	0	0	0	3	0
4	Dilución madre	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10 <sup>-4</sup>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10 <sup>-5</sup>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10 <sup>-6</sup>	+++	+++	+++	+++	+++	+	2	+	+	+	+
5	Dilución madre	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
	10 <sup>-4</sup>	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
	10 <sup>-5</sup>	+	3	8	+	+	0	0	0	0	0	0
	10 <sup>-6</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

91.6%, 88% contra 52%, y 56% contra 40% para el medio de Sula y Löwenstein-Jensen en las diluciones 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup>, respectivamente. En el cuadro 4 se puede observar que el desarrollo es más precoz en el medio de Sula que en el de Löwenstein-Jensen: de los tubos positivos en ambos medios, el 87.1% lo fueron en el medio liofilizado a la tercera semana de inoculados, mientras que en Löwenstein-Jensen, en el mismo período, se obtuvo el 72.8% de positivos.

En el cuadro 5 se encuentra la correlación de positividad en ambos medios seis semanas después de la inoculación. Todos los cultivos positivos en Löwenstein-Jensen fueron también positivos en medio de Sula y se obtuvieron 15 positivos en este medio, de

los cuales 15 fueron negativos y uno contaminado en el Löwenstein-Jensen.

**Experiencia 2**

Se trataba de determinar la posibilidad de reemplazar el medio de Löwenstein-Jensen por el medio liofilizado de Sula en nuestro trabajo de rutina.

Todo material remitido al Laboratorio para búsqueda de bacilos de Koch fue sembrado en los dos medios en estudio. La experiencia consistió en sembrar dos tubos de medio líquido con el mismo inóculo que se siembran los tubos de Löwenstein-Jensen en nuestro trabajo de rutina, y se realizó en 1,517 muestras de esputos y frotis laríngeos.

Se trataron 2 ml de esputo con fosfato trisódico al 10% durante 24 horas a 37°C,

CUADRO 3—Resultados comparativos de la sensibilidad del medio liofilizado de Sula y del de Löwenstein-Jensen según el número de tubos positivos obtenidos seis semanas después de la inoculación.

Dilución	Löwenstein-Jensen		Medio de Sula	
	No. de tubos positivos	%	No. de tubos positivos	%
Dilución madre	25	100	25	100
10 <sup>-4</sup>	22	91.6	25	100
10 <sup>-5</sup>	13	52	22	88
10 <sup>-6</sup>	10	40	14	56

CUADRO 4—Resultados comparativos de la sensibilidad del medio liofilizado de Sula y del de Löwenstein-Jensen según la precocidad en la obtención de cultivos que fueran positivos en ambos medios a la tercera semana.

	Löwenstein-Jensen		Medio de Sula	
	No. de tubos positivos	%	No. de tubos positivos	%
Total	70	100	70	100
A la tercera semana	51	72.8	61	87.1

neutralizados con ácido clorhídrico y rojo de fenol, y centrifugados a 3,000 rpm durante 30 minutos.

Cuando se trataba de frotis laríngeo se agregaba fosfato trisódico en el mismo tubo que contenía el hisopo; luego de neutralizar y centrifugar, el líquido sobrenadante fue desechado y el sedimento diluido con 2 ml de agua destilada estéril.

Fueron sembrados 0.2 ml del sedimento en cada uno de dos tubos con medio de Löwenstein-Jensen y la misma cantidad en cada uno de dos tubos con medio liofilizado reconstituido de Sula.

Las lecturas se practicaron a las ocho semanas, según la siguiente escala:

*Medio Löwenstein-Jensen*

- ++++ Desarrollo confluyente
- +++ Colonias incontables
- ++ Más de 20 colonias
- + 10 a 20 colonias

Hasta 9 colonias, informar el número de colonias

- C Contaminados
- C+ Contaminado positivo
- O Negativo

En cuanto al criterio de evaluación, por lo menos uno de los tubos debía ser positivo para que el cultivo se computara como positivo; por lo menos uno de los tubos debía ser negativo para que se computara el cultivo como negativo, excluyéndose las mues-

tras en que hubiera aparecido algún positivo; si en un cultivo un tubo fue negativo y otro contaminado, se computó el cultivo como negativo.

No se computaron las muestras en las que todos los tubos en ambos medios o dos de los tubos en uno de los medios fueron contaminados, aunque seis cultivos contaminados en medio de Sula fueron positivos a la coloración de Ziehl-Neelsen.

Los resultados obtenidos pueden verse en el cuadro 6. Se obtuvieron 203 cultivos positivos en medio liofilizado reconstituido de Sula y 220 en el de Löwenstein-Jensen. Esta diferencia, que no es estadísticamente significativa (véase el anexo I), sería aún

*Medio liofilizado de Sula*

- ++++ Sedimento más desarrollo en superficie
- +++ Sedimento
- ++ Más de 20 colonias
- + 10 a 20 colonias

Hasta 9 colonias, informar el número de colonias

- C Contaminados
- C+ Contaminado positivo
- O Negativo

menor si se considera que seis cultivos contaminados en medio de Sula y que fueron positivos a la coloración de Ziehl-Neelsen hubiesen dado sus cultivos positivos. Del total de 1,517 cultivos realizados en ambos medios fueron tabulados sólo 1,460, ya que

CUADRO 5—Correlación de los cultivos positivos obtenidos en la determinación del grado de sensibilidad del medio liofilizado de Sula y del de Löwenstein-Jensen.

Medio liofilizado de Sula	Medio de Löwenstein-Jensen		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	70	15	85
Negativos	0	14	14
Total	70	29	99 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Un cultivo fue eliminado por haber sido contaminado (cuadro 2, paciente 3, dilución 10<sup>-5</sup>, medio de Löwenstein-Jensen).

CUADRO 6—Correlación entre cultivos positivos y negativos en medio liofilizado reconstituido de Sula y Löwenstein-Jensen.

Medio de Sula	Medio Löwenstein-Jensen			
	Positivos	Negativos	Total	%
Positivos	180	23	203	13.904
Negativos	40	1,217	1,257	86.096
Total	220	1,240	1,460	100.00
%	15.068	84.932	100.0	

CUADRO 7—Correlación de los cultivos contaminados en medio liofilizado y reconstituido de Sula y en el de Löwenstein-Jensen.

Medio de Sula \ Medio Löwenstein-Jensen	Contaminados	No contaminados	Total	%
Contaminados	17	38	55	3.63
No contaminados	2	1,460	1,462	96.37
Total	19	1,498	1,517	100.0
%	1.25	98.75	100.0	

los restantes no satisfacían el criterio de evaluación por haber estado contaminados.

En el cuadro 7 se puede ver el número, porcentaje y correlación de los cultivos contaminados.

Se consideró cultivo contaminado cuando los dos tubos del mismo medio sembrados con el mismo inóculo fueron contaminados.

### Resumen y conclusiones

El medio liofilizado de Sula en las condiciones en que se realizó la primera experiencia se ha mostrado más sensible al desarrollo del *Mycobacterium tuberculosis* que el medio de Löwenstein-Jensen. En vista de los resultados obtenidos en esta experiencia se decidió realizar un estudio comparativo entre ambos medios, introduciendo el medio liofilizado y reconstituido de Sula al trabajo de rutina.

En la segunda experiencia, del total de cultivos contaminados, 17 lo fueron en

ambos medios, 38 sólo en medio de Sula y 2 sólo en el de Löwenstein-Jensen. Las diferencias en favor de la menor contaminación del Löwenstein-Jensen son estadísticamente significativas (véase el anexo II). Sin embargo, los porcentajes de contaminación para cualquiera de los medios—3.63 para el liofilizado y 1.25 para el Löwenstein-Jensen—deben considerarse como razonablemente aceptables en el trabajo de rutina en los laboratorios de lucha antituberculosa.

El medio liofilizado reconstituido de Sula se ha mostrado tan eficaz como el medio de Löwenstein-Jensen en el trabajo de rutina.

Las experiencias realizadas parecen demostrar suficientemente la eficacia del medio de cultivo experimentado y, consiguientemente, mayores posibilidades para su utilización en la lucha antituberculosa.

La disponibilidad de un medio de cultivo que facilita el diagnóstico bacteriológico por cultivo en los lugares de recolección de las muestras podría traer como consecuencia una mayor cobertura en la búsqueda de casos por este procedimiento.

Sin embargo, este problema no podrá ser resuelto sólo por la vía de un medio de fácil preparación y larga duración, como el medio en estudio. Será necesario que a las ventajas del medio liofilizado de Sula se agreguen las de alguna técnica de cultivo que pueda prescindir de aparatos y elementos de laboratorio, tales como centrifugas y pipetas, si se ha de llegar a la tan anhelada meta del diagnóstico bacteriológico aun en laboratorios de recursos limitados. □

**Anexo I**

**Prueba de significación del cuadro 6**

Se aplicará la prueba no paramétrica de MacNeman por cuanto la escala donde se mide la variable es de tipo clasificación y la comparación se hace para dos muestras relacionadas.

Resultados en el medio de Löwenstein-Jensen			
		Negativos	Positivos
Resultados en el medio liofilizado de Sula	Positivos	A	B
	Negativos	C	D
	Total		

A: Número de cultivos positivos en el medio liofilizado de Sula y negativos en el medio de Löwenstein-Jensen.

D: Número de cultivos negativos en el medio liofilizado de Sula y positivos en el medio de Löwenstein-Jensen.

La  $H_0$  que interesa probar es la siguiente:

$$H_0: pA = pD$$

El número de cultivos positivos en el medio liofilizado de Sula y negativos en el medio de Löwenstein-Jensen es igual al número de cultivos negativos en el medio liofilizado de Sula y positivos en el medio de Löwenstein-Jensen.

Contra la hipótesis de alternativa:

$$H_1: pA \neq pD$$

Resultados en el medio de Löwenstein-Jensen				
		Negativos	Positivos	Total
Resultados en el medio liofilizado de Sula	Positivos	23	180	203
	Negativos	1,217	40	1,257
	Total	1,240	220	1,460

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

$$\chi^2 = \frac{[A - \frac{1}{2}(A + D)]^2 + [D - \frac{1}{2}(A + D)]^2}{\frac{A + D}{2}}$$

Trabajando con la estadística mejorada de Yates tenemos:

$$\chi^2_{(1)} = \frac{([A - D] - 1)^2}{A + D}$$

$$\chi^2_{(1)} = \frac{([23 - 40] - 1)^2}{40 + 23} = \frac{256}{63}$$

$$\chi^2_{(1)} = 4.06 \quad \chi^2_{(2.5\%)} = 5.02 \quad \chi^2_{(1\%)} = 6.63$$

Comparando este resultado con  $\chi^2$  de un grado de libertad y un nivel del 2.5% se acepta la  $H_0$ . También se acepta la  $H_0$  si comparamos con  $\chi^2$  de un grado de libertad y un nivel del 1 por ciento.

**Anexo II**

**Prueba de significación del cuadro 7**

Prueba no paramétrica de Mac Neman.

Medio de Löwenstein-Jensen				
		No contaminado	Contaminado	Total
Medio liofilizado de Sula	Contaminado	38	17	55
	No contaminado	1,460	2	1,462
	Total	1,498	19	1,517

$$H_0: Pca = Pcd$$

$$H_1: Pca \neq Pcd$$

Aplicando la estadística mejorada de Yates se tiene:

$$\chi^2_{(1)} = \frac{([A - D] - 1)^2}{A + D}$$

$$\chi^2_{(1)} = \frac{([38 - 2] - 1)^2}{38 + 2} = \frac{1,225}{40}$$

$$\chi^2_{(1)} = 30.6$$

$$\chi^2_{(5\%)} = 3.84$$

$$\chi^2_{(2.5\%)} = 5.02$$

$$\chi^2_{(1\%)} = 6.63$$

Comparando el resultado obtenido con  $\chi^2$  de un grado de libertad al nivel del 5%, se rechaza la  $H_0$ . Lo mismo ocurre si comparamos con  $\chi^2$  de un grado de libertad a los niveles del 2.5 y 1 por ciento.

En consecuencia se concluye: existe diferencia significativa entre contaminación en el medio liofilizado de Sula y el medio de Löwenstein-Jensen.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Organización Mundial de la Salud. "Programme de recherche de l'OMS sur la tuberculose". WHO/TB/Techn. Inf., 17 (rev. 4), 1964.
- (2) Sula, Ladislav. "WHO Co-operative Studies on a Simple Culture. Technique for the Isolation of Mycobacteria". Part I. *Bull WHO* 29(5): 589-606, 1963.
- (3) Sula, Ladislav y Sundaresan, T. K. "WHO Co-operative Studies on a Simple Culture Technique for the Isolation of Mycobacteria". Part II, *Bull WHO* 29(5): 607-625, 1963.
- (4) Delgado Blanco, J. y Peña, R. "Revisión de las técnicas usadas en el Departamento de Bacteriología del Instituto Nacional de Tuberculosis, etc." Informe mimeografiado del Curso de Entrenamiento en Microbiología de la Tuberculosis. Instituto Nacional de Tuberculosis, El Algodonal, Caracas, Venezuela, 1966.
- (5) Scocozza, Juan B. *Rozhl Tuberk* 26(10): 696-699, 1966.
- (6) Salazar Alegre, O. "Estudio comparativo de las posibilidades de los medios de Löwenstein-Jensen y liofilizado reconstituido de Sula para el aislamiento del *Mycobacterium tuberculosis*". *Bol Ofic Sanit Panamer* 63(1): 13-16, 1967.
- (7) Blancarte, Lamberto, Anzaldo de Jaime, Georgina, y Campos B., Bertha Luz, "Estudio comparativo del medio liofilizado de Sula y Löwenstein-Jensen en el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*". *Rev Invest* 27(4): 327-332, 1967.

#### Lyophilized Sula Medium a Possible Substitute for Löwenstein-Jensen Medium in TB Campaign Laboratories (Summary)

In a first experiment made, lyophilized Sula medium proved to be more sensitive to the development of *Mycobacterium tuberculosis* than the medium of Löwenstein-Jensen. In view of these results, a comparative study was made of both media and the regular use of reconstituted lyophilized Sula medium was added.

In the second experiment, of the total of contaminated cultures, 17 were made in both media, 38 in the Sula medium only, and 2 in only the Löwenstein-Jensen medium. There were statistically significant differences in favor of less contamination in the Löwenstein-Jensen medium, yet the contamination percentages of both media—3.63 for the lyophilized and 1.25 for the Löwenstein-Jensen—should be considered reasonably acceptable percentages in routine tuberculosis laboratory work.

The reconstructed lyophilized Sula medium

was as effective as the Löwenstein-Jensen medium when used in routine work.

The experiments in question seem to offer sufficient proof of the efficacy of the culture medium tested, and point to the possibility of its increased use in a tuberculosis campaign.

The availability of a culture medium which facilitates bacteriological diagnosis in the place where samples are collected could lead to increased case-finding coverage. However, the problem cannot be solved by the sole use of an easily prepared and long-lasting medium such as the one under study; some culture technique will have to be added to the advantages of the lyophilized Sula medium that will eliminate the need for such laboratory equipment as centrifuge and pipette, if the goal of bacteriological diagnosis in a laboratory with limited resources is to be reached.

#### Possibilidade de Substituir o Meio de Löwenstein-Jensen pelo Liofilizado de Sula nos Laboratórios de Luta Antituberculosa (Resumo)

O meio liofilizado de Sula, nas condições em que se realizou a primeira experiência, demonstrou ser mais sensível ao desenvolvimento do *Mycobacterium tuberculosis* que o meio de Löwenstein-Jensen. Em vista dos resultados obtidos com essa experiência, decidiram os autores realizar um estudo comparativo dos dois meios, introduzindo o meio liofilizado e reconstituído de Sula no trabalho de rotina.

Na segunda experiência, do número total de culturas contaminadas, 17 o foram em ambos os meios, 38 apenas no meio de Sula e 2 somente no de Löwenstein-Jensen. As diferenças em favor da menor contaminação do Löwenstein-Jensen são estatisticamente significativas. Entretanto, as percentagens de contaminação para qualquer dos dois meios—3.63 para o liofilizado e 1.25 para o Löwenstein-

Jensen—devem ser consideradas como razoavelmente aceitáveis no trabalho de rotina dos laboratórios da luta antituberculosa.

O meio liofilizado reconstituído de Sula mostrou-se tão eficiente quanto o meio de Löwenstein-Jensen no trabalho de rotina.

As experiências feitas parecem ter deixado suficientemente comprovada a eficiência do meio de cultura experimentado e, conseqüentemente, as vantagens de sua utilização na luta antituberculosa.

A disponibilidade de um meio de cultura que facilita o diagnóstico bacteriológico por esse

método nos lugares onde são colhidas as amostras poderia trazer como conseqüência maior cobertura na pesquisa de casos.

Entretanto, o problema não se resolverá apenas porque existe um meio de fácil preparação e longa duração como o que se estuda. É necessário que às vantagens do meio liofilizado de Sula se unam as de alguma técnica de cultura que possa dispensar os aparelhos e elementos de laboratório como centrífugas e pipetas para que se consiga fazer o diagnóstico bacteriológico mesmo em laboratórios de recursos limitados.

#### Possibilités de remplacer le milieu de cultures de Löwenstein-Jensen par des cultures lyophilisées de Sula dans les laboratoires de lutte antituberculeuse (Résumé)

Le milieu lyophilisé de Sula, dans les conditions dans lesquelles on a réalisé la première expérience, s'est révélé plus sensible au développement du *Mycobacterium tuberculosis* que le milieu de Löwenstein-Jensen. En raison des résultats obtenus au cours de cette expérience, il a été décidé d'effectuer une étude comparative entre les deux milieux, en utilisant le milieu lyophilisé et reconstitué de Sula.

Dans la deuxième expérience, sur le total des cultures contaminées, 17 l'ont été dans les deux milieux, 38 seulement dans le milieu de Sula et 2 seulement dans le milieu de Löwenstein-Jensen. Les différences enregistrées en faveur de la contamination moindre du Löwenstein-Jensen sont importantes du point de vue statistique. Toutefois, les pourcentages de contamination pour l'un quelconque des deux milieux—3.63 pour le lyophilisé et 1.25 pour le Löwenstein-Jensen—doivent être considérés comme normalement acceptables dans les travaux courants des laboratoires de lutte antituberculeuse.

Le milieu lyophilisé reconstitué de Sula s'est révélé aussi efficace que le milieu de Löwen-

stein-Jensen au cours des travaux courants.

Les expériences réalisées semblent suffisamment démontrer l'efficacité du milieu de culture expérimenté et, en conséquence, de plus grandes possibilités pour son utilisation dans la lutte antituberculeuse.

La possibilité d'utiliser un milieu de culture qui facilite grâce à cette culture, le diagnostic bactériologique dans les lieux de rassemblement des échantillons pourrait entraîner comme conséquence une plus grande couverture dans le dépistage des cas au moyen de cette méthode.

Toutefois, se problème ne pourra être résolu que par la voie d'un milieu de préparation simple et de longue durée, tel que le milieu qui fait l'objet de cette étude. Il sera nécessaire que viennent s'ajouter aux avantages du milieu lyophilisé de Sula ceux de quelque méthode de culture qui peut se passer d'appareils et de matériel de laboratoire, tels que centrifugeuses et pipettes, si l'on veut atteindre le but tant recherché du diagnostic bactériologique, même dans les laboratoires disposant de ressources limitées.