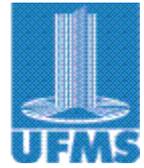




Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



**PAULO RICARDO DE SOUZA MORAES**

**DESEMPENHO DO MÉTODO OGAWA-KUDOH EM CULTURA DE  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DE AMOSTRAS PAUCIBACILARES**

**CAMPO GRANDE - MS  
2021**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



**PAULO RICARDO DE SOUZA MORAES**

**DESEMPENHO DO MÉTODO OGAWA-KUDOH EM CULTURA DE  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DE AMOSTRAS PAUCIBACILARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Anamaria Mello Miranda Paniago

Co-orientação: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eunice Atsuko Totumi Cunha

**CAMPO GRANDE - MS  
2021**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### DESEMPENHO DO MÉTODO OGAWA-KUDOH EM CULTURA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DE AMOSTRAS PAUCIBACILARES

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.  
Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anamaria Mello Miranda Paniago  
Co-orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Atsuko Totumi Cunha

A banca examinadora, após a avaliação do trabalho atribuiu ao candidato o conceito \_\_\_\_\_.

#### BANCA EXAMINADORA

#### CONCEITO

---

Dr<sup>a</sup>. Anamaria Mello Miranda Paniago - PRESIDENTE

---

Dr. Paulo de Tarso Guerrero Müller - MEMBRO TITULAR - UFMS

---

Dr<sup>a</sup>. Marli Marques - MEMBRO TITULAR - UFMS

---

Dr<sup>a</sup>. Crhistine Cavalheiro Maymone Gonçalves - MEMBRO TITULAR  
- UFMS/SES

---

Dr. Artemir Coelho de Brito - MEMBRO TITULAR - MINISTÉRIO  
DA SAÚDE

## AGRADECIMENTOS

Esta etapa da tese me fez lembrar o que ocorreu ao longo desses cinco anos. Anos esses que ficarão muito marcados na vida de todos nós, por essa pandemia do covid 19, que nos assombra mundialmente. Mas, neste momento, imagino a significância e o valor de pessoas que estiveram juntos de minha trajetória.

Sempre fui uma pessoa de muita fé e, primeiramente, gostaria de agradecer a minha Nossa Senhora de Perpétuo Socorro, que sempre intercedeu junto a seu filho nos momentos de angústia e tristeza, pedindo a ELE para me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Meu pai Arindo (*in memorian*) tinha o desejo de ter um filho “doutor”, como ele dizia para pessoas que possuía uma graduação. Infelizmente, ele não pode estar presente ao meu lado na minha vida acadêmica, mas certamente me acompanhava, protegia e me orientava junto ao PAI. Hoje realizo um sonho do senhor! Mas, agradeço a DEUS por manter minha mãe Creuza ao meu lado, com força e saúde, me apoiando sempre nas minhas decisões. Este título também é para senhora, muito obrigado!

Aos meus familiares, agradeço imensamente o apoio. Mas, quero fazer uma homenagem especial a minha tia Cleonice, professora aposentada da UFMS, que sempre foi um exemplo de profissional para mim.

Agradeço a minha esposa Andrea, companheira desde os tempos de faculdade, onde estudávamos juntos e que dali, brotou um amor que se tornou a razão de eu viver. Amor esse que Deus nos presenteou com dois filhos maravilhosos, Matheus e Paola; que estando no meu lado com suas inocências, me faziam esquecer as dificuldades que aconteciam. Muito obrigado por vocês existirem e me apoiarem!

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Anamaria Paniago, pela confiança, incentivo, colaboração nas revisões e cobranças necessárias, para que eu chegasse ao meu objetivo, contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal.

A minha Coorientadora Dr<sup>a</sup>. Eunice Atsuko Totumi Cunha, que me acolheu no LACEN/MS em 01/08/2002 e desde então, me proporcionou incansavelmente parte de seus conhecimentos, mostrando sua dedicação com o serviço público e me ensinou a gostar pelo diagnóstico da tuberculose. Resumir todos esses anos de amizade, em poucas palavras é quase impossível, mas serei eternamente grato por fazer parte da minha história.

A grande equipe do LACEN, por ter me aberto às portas para o desenvolvimento das pesquisas de especialização, mestrado e agora doutorado. Em especial, ao Sr. Ademir, pela seleção, triagem e semeadura das amostras, me auxiliando muito na parte prática desta tese. Meus sinceros, muito obrigado!

A UFMS, Programa de Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, por me proporcionar os conhecimentos necessários, sendo importante para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus grandes amigos, que estiveram comigo desde a Graduação até o Doutorado, seja numa carona ou até mesmo no apoio das horas difíceis, mas posso citar alguns marcantes nesta caminhada. Obrigado Renato, André e Canino, mesmo que muitas vezes não estavam presentes, mas eu tinha confiança que poderia contar com vocês a qualquer momento.

A consolidação deste trabalho não seria possível sem a ajuda e contribuição de inúmeras pessoas, por isso, gostaria de expressar minha eterna gratidão e apreço a todos que fizeram a diferença para que esse projeto se tornasse realidade.

Muito obrigado a todos!

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito!”

Chico Xavier

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o desempenho do método Ogawa – Kudoh (OK) para o diagnóstico de tuberculose em materiais de amostra paucibacilar pulmonar e extrapulmonar, em relação ao processamento de Lowenstein-Jensen (LJ) e Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT). **Métodos:** Este estudo transversal utilizou amostras extrapulmonares e pulmonares (exceto escarro) recebidas no Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul entre fevereiro de 2017 e março de 2018. As amostras foram submetidas ao processamento de OK, LJ e MGIT de acordo com o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial de Tuberculose e Outras Micobactérias 2008. **Resultados:** Um total de 347 amostras (83,3% extrapulmonar, 16,7% pulmonar) foi semeado, em pelo menos um dos três meios (OK: 330; LJ: 314; MGIT: 113). A maioria das amostras extrapulmonares consistia de líquido cefalorraquidiano (28,2%), medula óssea (20,5%) e fragmentos de tecido (16,7%). As amostras pulmonares foram predominantemente lavadas brônquico alveolar (6,9%) e secreção traqueal (9,8%). Adotando o MGIT como referência, o OK provou ser 75% sensível e 100% específico. Com LJ como referência, a sensibilidade de OK foi de 57,1% e a especificidade de 96,3%. As categorias de concordância foram as seguintes: OK vs. LJ, moderada ( $\kappa = 0,485$ ); OK vs. MGIT, quase perfeito ( $\kappa = 0,851$ ); LJ vs. MGIT, substancial ( $\kappa = 0,655$ ). O método OK se mostrou preciso e específico para o diagnóstico de tuberculose em materiais de amostra paucibacilar pulmonar e extrapulmonar, fornecendo a mesma precisão que LJ e MGIT, caracterizando a abordagem como uma ferramenta laboratorial valiosa para investigar casos de suspeita de tuberculose em instalações laboratoriais com recursos limitados.

**Descritores:** *Mycobacterium tuberculosis*; Tuberculose; Diagnóstico; Meios de Cultivo.

## ABSTRACT

**Objective:** To assess the performance of the Ogawa–Kudoh (OK) method for tuberculosis diagnosis in pulmonary and extrapulmonary paucibacillary sample materials, relative to Lowenstein-Jensen (LJ) and Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) processing. **Methods:** This cross-sectional study employed extrapulmonary and pulmonary samples (other than sputum) received at the Mato Grosso do Sul Central Public Health Laboratory between February 2017 and March 2018. The samples were subjected to OK, LJ, and MGIT processing as per the 2008 National Manual for Laboratory Surveillance of Tuberculosis and Other Mycobacteria. **Results:** A total of 347 samples (83.3% extrapulmonary, 16.7% pulmonary) were seeded in at least one of three media (OK: 330; LJ: 314; MGIT: 113). Most extrapulmonary samples consisted of cerebrospinal fluid (28.2%), bone marrow (20.5%), and tissue fragments (16.7%). Pulmonary samples were predominantly alveolar bronchial lavage (6.9%) and tracheal secretion (9.8%). Adopting MGIT as a reference, OK proved 75% sensitive and 100% specific. With LJ as the reference, OK sensitivity was 57.1% and specificity 96.3%. Agreement categories were as follows: OK vs. LJ, moderate ( $\kappa = 0.485$ ); OK vs. MGIT, almost perfect ( $\kappa = 0.851$ ); LJ vs. MGIT, substantial ( $\kappa = 0.655$ ). The OK method proved accurate and specific for diagnosing tuberculosis in pulmonary and extrapulmonary paucibacillary sample materials, providing the same accuracy as LJ and MGIT, characterizing the approach as a valuable laboratory tool for investigating cases of suspected tuberculosis in laboratory facilities with limited resources.

**Descriptors:** *Mycobacterium tuberculosis*; Tuberculosis; Diagnosis; Culture media.

## LISTA DE TABELAS

| <b>Tabela</b> | <b>Descrição</b>   | <b>Pág.</b> |
|---------------|--|-------------|
| <b>1</b>      | Distribuição por tipo de amostra recebida para cultura de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil.....  | <b>46</b>   |
| <b>2</b>      | Culturas realizadas para detecção de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em amostras extrapulmonares, lavado broncoalveolar e secreção traqueal. Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil.....   | <b>48</b>   |
| <b>3</b>      | Precisão do método Ogawa-Kudoh (OK), em comparação com Löwenstein-Jensen (LJ), Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT) e associação LJ + MGIT. Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil.....                           | <b>49</b>   |
| <b>4</b>      | Grau de concordância entre os métodos Ogawa – Kudoh (OK), Löwenstein – Jensen (LJ) e Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT) em amostras pulmonares e extrapulmonares no Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil..... | <b>50</b>   |
| <b>5</b>      | Positividade das culturas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , por tipo de amostra e método. Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil .....  | <b>50</b>   |

## LISTA DE FIGURAS

| <b>Figura</b> | <b>Descrição</b>  | <b>Pág.</b> |
|---------------|---|-------------|
| <b>1</b>      | Países prioritários de alta carga para TB, TB / HIV e MDR-TB durante o período 2016-2020, e suas áreas de sobreposição .....  | <b>18</b>   |
| <b>2</b>      | Países que tiveram pelo menos 100.000 casos incidentes de TB em 2019  | <b>19</b>   |
| <b>3</b>      | Coefficiente de incidência de tuberculose geral e por faixa etária (por 100 mil hab.). Brasil, 2010 a 2019 <sup>a</sup> ..... | <b>20</b>   |
| <b>4</b>      | Coefficiente de mortalidade por tuberculose (por 100 mil hab.). Brasil, 2009 a 2018 <sup>a</sup> .....                        | <b>20</b>   |
| <b>5</b>      | Porcentagem de casos extrapulmonares entre casos novos e recidivas em 2019 .....  | <b>23</b>   |
| <b>6</b>      | Etapas da coloração de Ziehl-Neelsen .....  | <b>27</b>   |
| <b>7</b>      | Meio Löwenstein-Jensen .....  | <b>30</b>   |
| <b>8</b>      | Fluxograma de semeadura no meio Ogawa-Kudoh.....  | <b>31</b>   |
| <b>9</b>      | Meio Ogawa-Kudoh .....  | <b>33</b>   |
| <b>10</b>     | MGIT 960® ( <i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i> - Becton & Dickinson).....  | <b>34</b>   |
| <b>11</b>     | GeneXpert.....  | <b>35</b>   |
| <b>12</b>     | Fluxograma do número de amostras recebidas e semeadas pelo LACEN de março de 2017 a março de 2018 .....                       | <b>44</b>   |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|        |  |
|--------|--|
| AIDS   | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida   |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária   |
| BAAR   | Bacilo Álcool-Ácido Resistente   |
| BK     | Bacilo de Koch   |
| CGPNCT | Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Tuberculose  |
| IBGE   | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  |
| LACEN  | Laboratório Central de Saúde Pública   |
| LJ     | Lowenstein-Jensen  |
| MDR-TB | Tuberculose Multi-Droga Resistente   |
| MGIT   | Mycobacteria Growth Indicator Tube   |
| MNT    | micobactérias não causadoras de tuberculose  |
| MS     | Mato Grosso do Sul   |
| OK     | Ogawa-Kudoh  |
| OMS    | Organização Mundial de Saúde   |
| PCR    | Reação em Cadeia da Polimerase   |
| PNB    | Ácido $\rho$ -nitrobenzóico  |
| PNCT   | Programa Nacional de Controle da Tuberculose   |
| POP    | Procedimentos Operacionais Padrão  |
| SIM    | Sistema de Informações sobre Mortalidade   |
| SINAN  | Sistema Nacional de Agravos de Notificação   |
| SIRE   | <b>S</b> – estreptomicina (SM), <b>I</b> – isoniazida (INH), <b>R</b> – Rifampicina (RMP) e <b>E</b> – etambutol (EMB) |
| SITETB | Sistema de Informação de Tratamentos Especiais de Tuberculose  |
| SNC    | Sistema Nervoso Central  |
| SUS    | Sistema Único de Saúde   |
| TARV   | Terapia Antiretroviral   |
| TB     | Tuberculose  |
| TBEP   | Tuberculose Extrapulmonar  |
| TDO    | Tratamento Diretamente Observado   |
| TRM    | Teste Rápido Molecular   |
| TS     | Teste de Sensibilidade   |
| WHO    | World Health Organization  |

## SUMÁRIO

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 13 |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 16 |
| 2.1      | Tuberculose.....   | 16 |
| 2.1.1    | Histórico.....   | 16 |
| 2.1.2    | Panorama Global.....   | 17 |
| 2.1.3    | Panorama Nacional.....   | 19 |
| 2.1.4    | Panorama em Mato Grosso do Sul.....  | 21 |
| 2.2      | Apresentação da Tuberculose.....   | 21 |
| 2.2.1    | Tuberculose Extrapulmonar (TBEP).....  | 21 |
| 2.2.2    | Formas Extrapulmonar da Tuberculose.....   | 23 |
| 2.3      | Diagnóstico da Tuberculose.....  | 25 |
| 2.3.1    | Baciloscopia.....  | 26 |
| 2.3.2    | Cultura.....   | 28 |
| 2.3.2.1  | Pré-tratamento das amostras.....   | 29 |
| 2.3.2.2  | Método Löwenstein-Jensen.....  | 30 |
| 2.3.2.3  | Método Ogawa-Kudoh.....  | 31 |
| 2.3.2.4  | Método MGIT 960® (Mycobacteria Growth Indicator Tube - Becton & Dickinson).....                          | 33 |
| 2.4      | Acurácia dos métodos de cultivo nos meios LJ, OK e MGIT para amostras de escarro.....                    | 35 |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 39 |
| 3.1      | Objetivo Geral.....  | 39 |
| 3.2      | Objetivos Específicos.....   | 39 |
| <b>4</b> | <b>METODOLOGIA</b> .....   | 40 |
| 4.1      | Modelo, local e período de estudo.....   | 40 |
| 4.2      | População do estudo e abrangência.....   | 40 |
| 4.3      | Definição adotada para as amostras do estudo.....  | 40 |
| 4.4      | Procedimentos para a pesquisa de BAAR, descontaminação, semeadura, incubação e leitura das amostras..... | 40 |
| 4.4.1    | POP para pesquisa de BAAR em amostras paucibacilares.....  | 41 |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.4.2    | POP para descontaminação.....   | 41        |
| 4.4.3    | POP para semeadura.....   | 41        |
| 4.4.4    | POP para incubação.....   | 42        |
| 4.4.5    | POP para leitura e interpretação dos resultados.....                          | 43        |
| 4.5      | Organização e análise dos dados.....  | 43        |
| 4.6      | Aspectos éticos.....  | 45        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>46</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO.....</b>   | <b>54</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>55</b> |
|          | <b>APÊNDICE – ARTIGO PUBLICADO NO <i>BRAZILIAN JOURNAL OF DEVELOPMENT</i></b> | <b>60</b> |
|          | <b>ANEXO - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....</b>                            | <b>75</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença cujo agente foi identificado por Robert Koch em 1882. O gênero *Mycobacterium* é constituído por espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*) e outras denominadas de micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT). O *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) é a espécie mais importante em termos clínicos, sendo o agente da tuberculose.

A tuberculose é transmitida de pessoa a pessoa pela inalação de aerossóis produzidos durante a expectoração em doentes que produzem tosse com comprometimento pulmonar. Acomete principalmente os pulmões, podendo atingir outros órgãos por disseminação linfohematogênica.

A Organização Mundial de Saúde (OMS), através de seus boletins informativos apresenta sistematicamente, projeções e metas, pactuadas com os países membros. No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio da Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (CGPNCT), planeja ações para o seu controle, que incluem diagnóstico, tratamento e cura. No entanto, a almejada erradicação da tuberculose se mostra difícil e desafiadora.

Alguns chegam a alegar ser a tuberculose um problema reemergente em nosso meio. Essa afirmativa poderá ser válida para alguns países europeus, e mesmo para os Estados Unidos da América, contudo, não é válida para o Brasil: para nós, a tuberculose não é problema de saúde pública emergente e tampouco reemergente. Ela é um problema presente e ficante há longo tempo (RUFFINO-NETTO, 2002, p. 51).

Em todo o mundo, a tuberculose continua representando uma das 10 principais causas de morte. Estima-se que 10,0 milhões de pessoas desenvolveram a tuberculose em 2018, causando 1,3 milhões de mortes, sendo 300.000 mortes entre pessoas com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (WHO, 2019). As maiorias das pessoas que desenvolveram tuberculose em 2019 estavam na Índia (26%), Indonésia (8,5%), China (8,4%), Filipinas (6,0%), Paquistão (5,7%), Nigéria (4,4%), Bangladesh (3,6%) e África do Sul (3,6%) e outros 22 países na lista de 30 com alta taxa de tuberculose foram responsáveis por 21% (WHO, 2020).

Organizar a rede de atenção local, tendo em vista a organização da Atenção Básica, unidades de pronto atendimento, referências e hospitais, para favorecer o acesso e a qualidade da assistência, desta forma, é garantido o tratamento de forma adequada e oportuna todos os

casos diagnosticados de tuberculose visando à integralidade do cuidado. Faz-se necessário identificar, mapear e capacitar às equipes da Atenção Básica sobre as ações de controle da tuberculose, realizando novas ações, implantando novos instrumentos no cuidado do paciente e buscando novos parceiros, a fim de realizar atividades colaborativas e buscando investimento à pesquisa e a implantação/implementação de novas estratégias (BRASIL, 2017).

Um dos desafios para o controle da doença se refere ao diagnóstico. Este pode ser feito utilizando as técnicas como a baciloscopia e cultura. A baciloscopia consiste na pesquisa do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) corado pelo método de Ziehl-Nielsen, sendo um método de simples execução, baixo custo, baixa sensibilidade, quando comparada a cultura.

A cultura do *Mycobacterium tuberculosis* é realizada pela semeadura das amostras clínicas em meios sólidos ou líquidos. Os meios sólidos tem a vantagem de apresentar menor custo e menor índice de contaminação, mas apresenta a desvantagem do maior tempo de crescimento bacteriano. O meio líquido automatizado possui a vantagem de crescimento mais rápido e menor contaminação e tem a desvantagem de, além de ser caro, excluir amostras com sangue (BRASIL, 2008).

Independente do método utilizado para cultura, esses permitem a identificação da espécie de micobactéria, além da possibilidade de investigação de resistência a drogas. Assim, a cultura segue sendo um importante instrumento para confirmação diagnóstica, diagnóstico diferencial com outras micobacterioses e principalmente, orientação terapêutica e ações de vigilância (BRASIL, 2008).

O mais comum material biológico para o diagnóstico da tuberculose é o escarro (espontâneo ou induzido), por apresentar maior riqueza bacilar e de mais fácil obtenção. Além do escarro, a maioria das amostras é de origem respiratória, tais como: lavado bronco-alveolar (LBA), escovado brônquico, fragmentos de tecido pulmonar, aspirado transtraqueal e lavado gástrico.

Há também outras amostras clínicas não respiratórias, que podem ser obtidas de sítios extra-pulmonares, como as formas pleural, ganglionar, osteoarticular, geniturinária, meníngea/sistema nervoso central intestinal, peritoneal ou pericárdica. Tais amostras são normalmente paucibacilares, sendo necessária a cultura para o diagnóstico da tuberculose (FANLO, TIBERIO, 2007).

O diagnóstico da tuberculose no Mato Grosso do Sul encontra-se descentralizado para os 79 municípios para a realização da baciloscopia e mais recentemente o TRM (GeneXpert®). No entanto, a semeadura em meio OK encontra-se restrita a 10 municípios.

Além desta rede de serviços, o Laboratório Central de Saúde (LACEN/MS) que é referência para o diagnóstico de TB pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em Mato Grosso do Sul, recebe anualmente média de 8.000 amostras para realizar cultura para *Mycobacterium tuberculosis* utilizando um ou mais métodos de cultivo.

O método Ogawa-Kudoh (OK) para amostras pulmonares está em fase de descentralização no Brasil, no entanto, Mato Grosso do Sul vem utilizando-o desde 1999 para o diagnóstico da tuberculose para amostras pulmonares. Para amostras de outros sítios, o material biológico deve ser encaminhado para semeadura no LACEN/MS, pois o mesmo é o laboratório de referência no Estado de Mato Grosso do Sul, sendo que essas amostras segue a diretriz da hierarquização, centralizando em laboratórios de referência, que possui pessoal técnico qualificado e apresenta maior estrutura de biossegurança.

O desempenho do método Ogawa-Kudoh (OK) para amostras de origem pulmonar está amplamente documentado e recomendado pelo Ministério da Saúde. No entanto, a utilização deste método para investigação de *Mycobacterium tuberculosis* em espécimes oriundas de sítios extrapulmonares é novidade para a comunidade científica, a despeito das evidências de seu desempenho em algumas amostras realizadas em nosso meio. Justifica-se a realização desta pesquisa com o objetivo de avaliar a acurácia do método OK para materiais biológicos paucibacilares, que compreende todos os materiais de suspeitos de tuberculose pulmonar ou extrapulmonar que não seja escarro. Espera-se que os resultados encontrados possam sinalizar a possibilidade de sua utilização a partir deste estudo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Tuberculose

#### 2.1.1 Histórico

Informações da antiguidade no que diz respeito à tuberculose relaciona sempre a doença com as camadas sociais que apresentavam grandes riquezas. Dos milhões de desamparados que morreram pela doença, tanto no passado como na modernidade, praticamente nenhuma notícia se tem relativamente aos seus sofrimentos e dramas. Há relatos de lesões ósseas de múmias egípcias, datando de cerca de 4.000 a. C. e que muitos faraós foram tuberculosos e morreram extremamente jovens, caracterizando que já sofriam do Mal de Pott. (ROSEMBERG, 1999).

A maioria das espécies do gênero *Mycobacterium* são organismos da água ou do solo, atribuindo-se assim que sua origem é ambiental e que depois de ter sofrido diversos processos de evolução com o tempo e sujeito a pressões de seleção, diferenciou-se. Estudos indicam que o *Mycobacterium tuberculosis* evoluiu do *Mycobacterium bovis*, na ocasião da domesticação de gado por humanos, hipótese essa aceita em razão de serem espécies que fazem parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e são bem próximas no que se refere às características genéticas (DANIEL, 2000).

A evidência mais antiga para tuberculose nas Américas deu-se ao encontro de uma múmia (através da datação do carbono 14, provou-se que viveu há 1.100 anos) no Peru. No seu pulmão encontrou-se calcificação e bacilos, que tinham DNA intactos, onde através de técnicas de biologia molecular, extraiu e identificou a inserção IS6110, específica do complexo *M. tuberculosis*, porém não se pode afirmar que houve uma migração dessas cepas para o norte da América do Sul (DANIEL, 2000; ROSEMBERG, 1999).

No Brasil há relatos do início da doença desde a época da colonização portuguesa, onde colonos e padres jesuítas infectados pela “peste branca”, na catequização dos índios, acabavam transmitindo a doença, causando a morte de muitos nativos. Sugere-se que o Padre Manuel da Nóbrega, chegado ao Brasil em 1549, tenha sido o primeiro indivíduo portador de tuberculose no país. Cartas de Inácio Loyola (1555) e de José de Anchieta (1583), destinadas ao reino de Portugal, relatava: “[...] os índios, ao serem catequizados, adoecem, na maior

parte, com escarro, tosse e febre, muitos cuspiendo sangue, a maioria morrendo com deserção das aldeias” (ROSEMBERG, 1999, p. 7).

No período de transição durante o Brasil Império, onde se iniciou as medidas sanitárias, estabelecendo novas regras para os serviços de saúde nas cidades, a doença já estava conhecida como “praga dos pobres”. Estes doentes eram atendidos pelas Santas Casas de Misericórdia e posteriormente nos sanatórios e dispensários. Mas essa concepção humanitária de assistência não fez com que diminuísse as taxas de morbimortalidade da doença (MACIEL *et al.*, 2012).

No século XIX, a tuberculose representou importante causa de mortalidade no Brasil, descrevendo-se cerca de 700 óbitos a cada 100.000 habitantes, acometendo particularmente intelectuais e artistas, criando-se uma visão lírica da doença. Esses tinham o desejo de contrair a doença, para que a mesma servisse de inspiração; alguns foram a óbito, como Casimiro de Abreu e José de Alencar, fazendo com que encerrasse essa fase romântica e iniciasse a fase de mal social (MACIEL *et al.*, 2012; RIOS. 2009).

A População Privada de Liberdade (PPL), indígenas, população moradora na rua, profissionais de saúde compõe uma das subpopulações de alto risco para a TB, apresenta dados preocupantes, uma vez que muitos estudos já apontam elevada incidência de doença ativa em comparação a população geral de várias partes do mundo. Essa população estará mais susceptível se apresentar alguma condição que afete sua resposta imunológica, tais como infecção por HIV, silicose, insuficiência renal crônica, ser receptor de órgão transplantado, entre outras (BRASIL, 2011).

### 2.1.2 Panorama Global

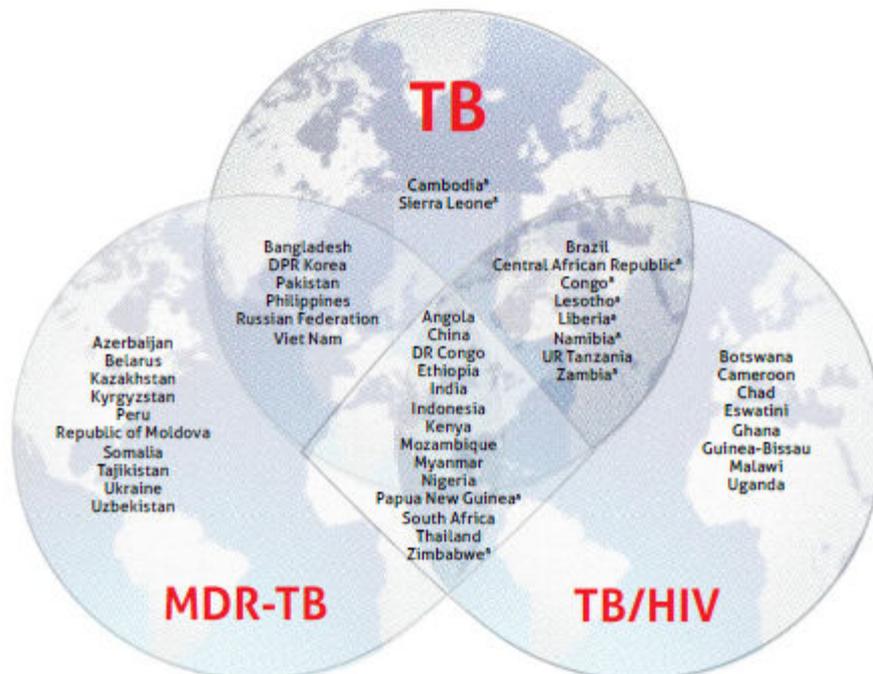
No mundo, a tuberculose é uma das 10 principais causas de morte e a principal causa por um único agente infeccioso, estando acima de HIV/Aids. Estima-se 10 milhões de pessoas adoeceram com tuberculose em 2019, número que vem diminuindo lentamente nos últimos anos. Entre 1,1-1,3 milhões de pessoas HIV-negativas morreram de tuberculose e houve um acréscimo de 208.000 mortes entre pessoas soropositivas. Homens com idade maior ou iguais há 15 anos representam 56%, mulheres 32% e crianças (< 15anos) 12%. Entre os afetados, 8,2% eram pessoas vivendo com HIV (WHO, 2020).

Um sério problema de saúde pública continua sendo a resistência aos medicamentos para o tratamento, onde 558.000 pessoas desenvolveram TB que era resistente à rifampicina, droga de primeira escolha e altamente eficaz e, destes, 82% tinham MDR-TB. Estima-se que

23% da população mundial tenham uma infecção latente por TB e correm o risco de desenvolver a tuberculose ativa durante a sua vida. Além desta situação de resistência, as metas propostas pela OMS para o fim da TB até 2020 ainda está muito aquém do esperado, necessitando da diminuição das taxas de incidência, mortalidade entre outras (WHO, 2018; WHO, 2020).

Enquanto nos últimos sete anos percebeu-se um significativo aumento no diagnóstico e tratamento de novos casos, bem como na notificação aos órgãos responsáveis, percebe-se que existem diversas lacunas persistentes (prevenção e cuidado integrado e centrado no paciente, políticas arrojadas e sistema de apoio relacionado ao componente social e intensificação da pesquisa e inovação) que ainda tem que ser vencidas. Somente com o cumprimento dessas metas se obterá o fim da tuberculose como problema de saúde pública e pode marcar uma nova etapa no cenário do controle da doença (BRASIL, 2017).

Figura 1 - Países prioritários de alta carga para TB, TB / HIV e MDR-TB durante o período 2016-2020, e suas áreas de sobreposição

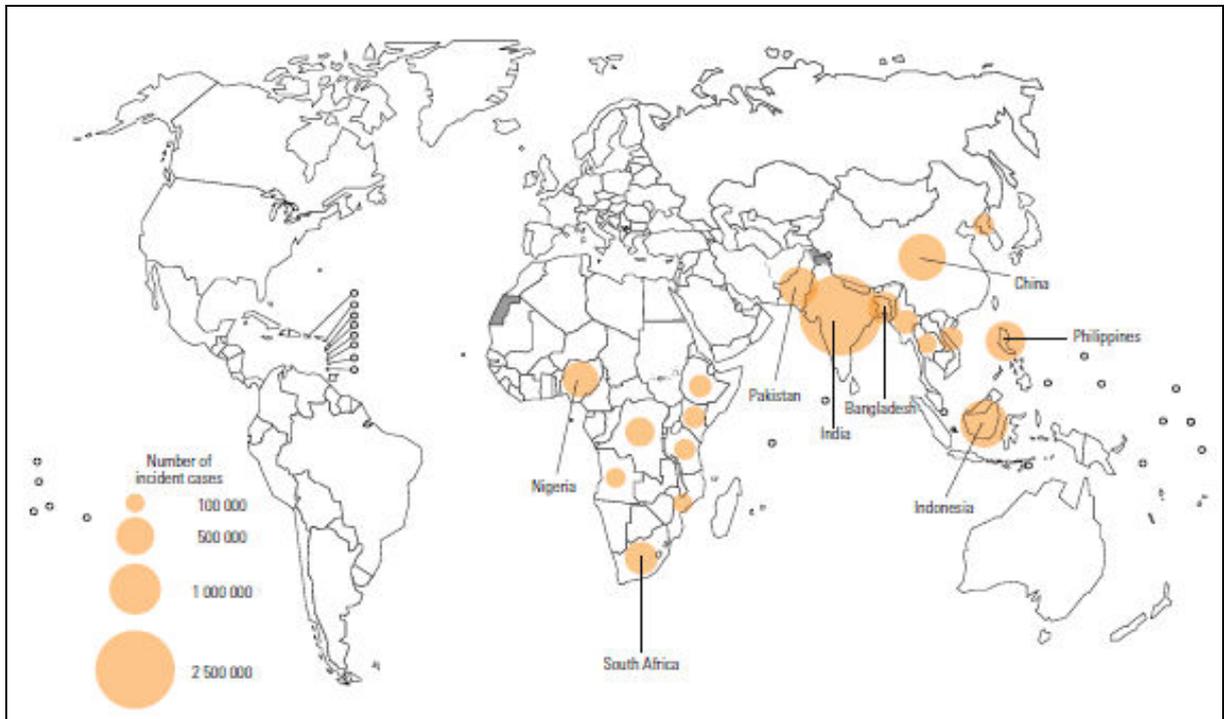


Fonte: WHO (2019).

Estimar os casos de tuberculose é uma tarefa muito difícil e desafiadora para as autoridades, devido ao alto índice de urbanização, grande desigualdade social e diversidade étnica e cultural. Desta forma, as notificações de casos de TB fornecem uma boa indicação da incidência de TB nos países onde o serviço de vigilância é eficiente, demonstrando as taxas

que dimensionam a real situação da doença, bem como o cuidado e o acesso aos serviços e os casos de subnotificação.

Figura 2 - Países que tiveram pelo menos 100.000 casos incidentes de TB em 2019.



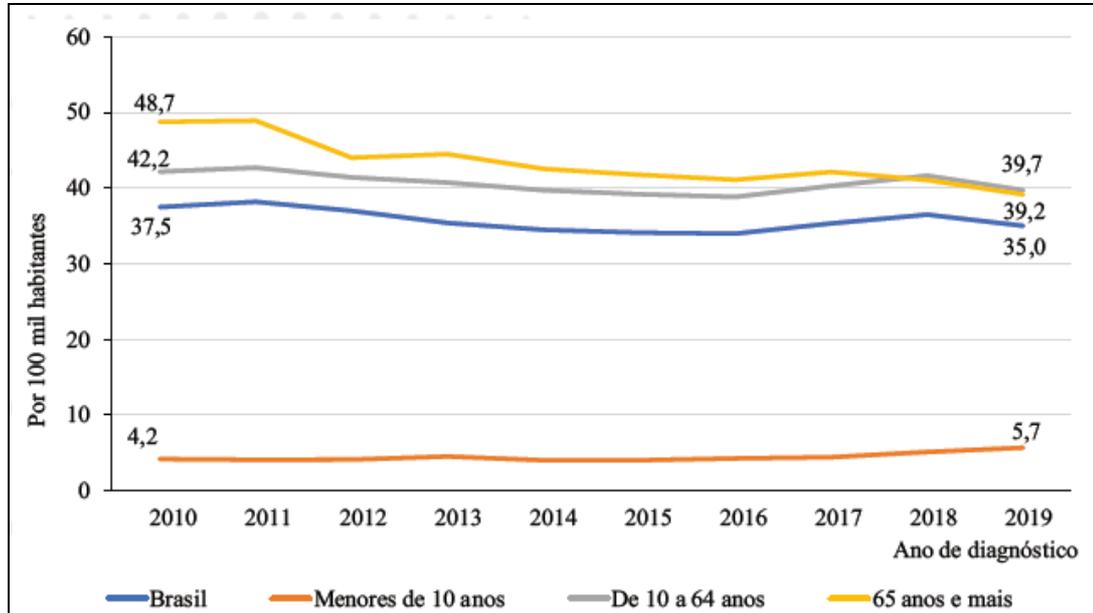
Fonte: WHO (2020). Observação: (Os oito países que estão entre o primeiro e o oitavo em termos de número de casos, e que responderam por dois terços dos casos globais em 2019)

### 2.1.3 Panorama Nacional

Em 2019, foram diagnosticados 73.864 casos novos de TB, o que corresponde a um coeficiente de incidência de 35,0 casos/100 mil habitantes, mostrando que esse coeficiente aumentou nos últimos dois anos. Cabe salientar que alguns Estados, como Rio de Janeiro, Amazonas, Pará, Roraima e Acre, apresentam um dos os maiores coeficientes de incidência, variando de 51 - 75 casos/100 habitantes. Quanto ao número de óbitos, o Brasil apresentou desde 2010 uma variação de 4.400 a 4.600, e o coeficiente de mortalidade, de 2,2 a 2,3 óbitos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2020).

Figura 3 - Coeficiente de incidência de tuberculose geral e por faixa etária (por 100 mil hab.). Brasil, 2010 a 2019<sup>a</sup>

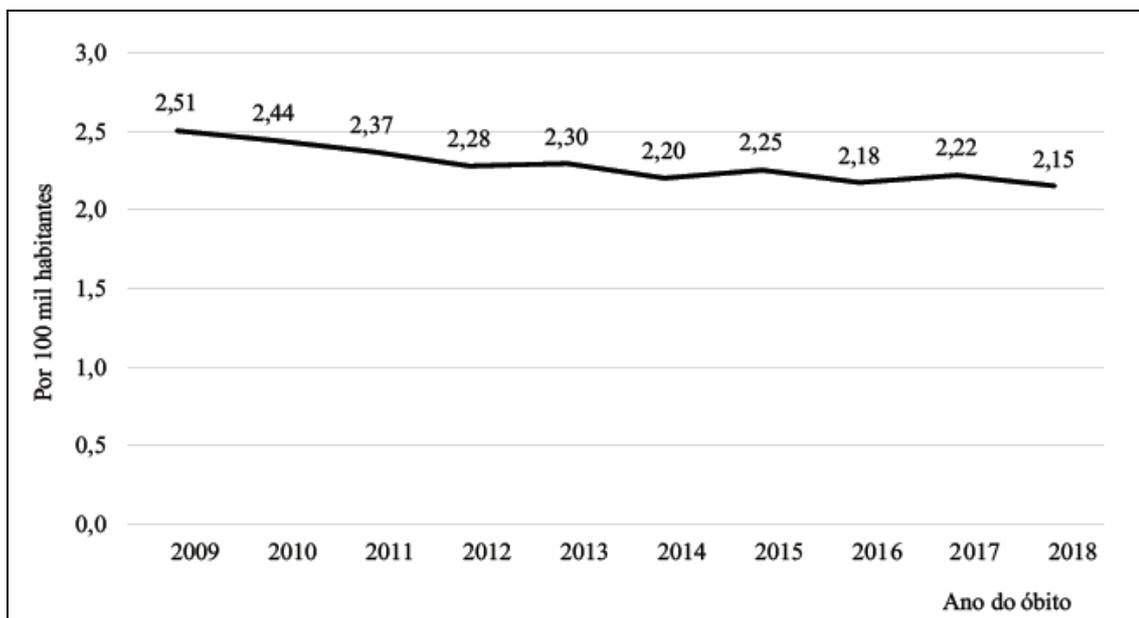
a Dados preliminares, sujeitos a alteração.



Fonte: Brasil (2020).

Figura 4 - Coeficiente de mortalidade por tuberculose (por 100 mil hab.). Brasil, 2009 a 2018<sup>a</sup>

a Dados preliminares, sujeitos a alteração.



Fonte: Brasil (2020).

Em 2019, foi solidificado a confirmação laboratorial com a implementação do teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB), sendo esse incorporado a baciloscopia e cultura de escarro já existente. Essa investigação laboratorial atingiu 72,2%, onde 37,7% dos casos novos foram diagnosticados pelo TRM-TB, 30,4% tiveram acesso ao exame de cultura e desses, 50,1% puderam realizar o teste de sensibilidade, conforme preconizado. A proporção de testagem para o HIV entre os casos novos de TB foi de 76,2% e 47,5% das pessoas com a coinfeção TB-HIV realizaram terapia antirretroviral (TARV) durante o tratamento de TB. Os valores encontrados no tratamento diretamente observado (TDO) de 38,4% e o abandono de tratamento dos casos novos com confirmação laboratorial foram 11,2% (BRASIL, 2020).

Em um país de dimensão continental, se faz necessário adotar estratégias para o enfrentamento da tuberculose e como consequência, a redução da incidência da doença. Deve-se planejar partindo da identificação de indicadores socioeconômicos associados ao coeficiente de incidência da doença e identificação de indicadores epidemiológicos e operacionais (BRASIL, 2011; BRASIL, 2019).

#### 2.1.4 Panorama em Mato Grosso do Sul

No Estado de Mato Grosso do Sul, os indicadores epidemiológicos e operacionais da TB demonstra que houve um total de 848 casos novos, um coeficiente de mortalidade de 2,0 /100 mil hab. (Brasil: 2,2), os casos novos de TB pulmonar confirmados por critério laboratorial somam 74,2% (Brasil: 72,2), o exame de cultura de escarro entre os casos pulmonares de retratamento foi de 35,8 (Brasil: 24,0), o teste de sensibilidade entre os casos de retratamento de TB pulmonar com cultura positiva foi de 29,4% (Brasil: 50,1%) e a testagem para HIV entre os casos novos foi de 80,8% (Brasil: 76,2%) (BRASIL, 2020).

## 2.2 Apresentação da Tuberculose

### 2.2.1 Tuberculose Extrapulmonar (TBEP)

Dentro do panorama atual, as formas extrapulmonares da tuberculose, embora não representem fatores de risco no que diz respeito à transmissão da doença, ganham cada vez mais importância, em virtude do aumento da sua incidência, seja nos países desenvolvidos ou não e da epidemia da AIDS. A maioria das formas extrapulmonares acontece em órgãos sem

condições ótimas de crescimento bacilar, sendo quase sempre de instalação insidiosa e evolução lenta (CAPONE *et al.*, 2006).

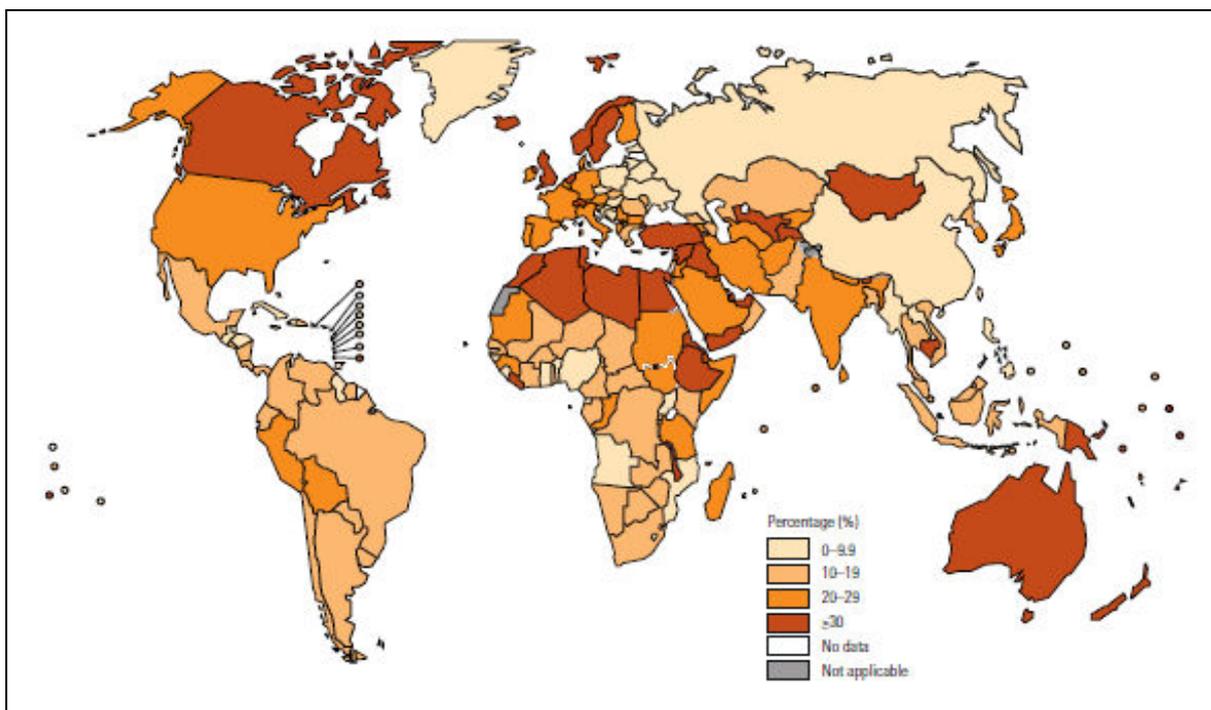
A maioria dos casos de tuberculose extrapulmonar existe como foco principal no pulmão, que após o *M. tuberculosis* penetrar no organismo pela via respiratória, pode disseminar-se e instalar-se em qualquer órgão, seja durante a primo-infecção (quando por condições imunológicas não há manifestação clínica da doença) ou depois desta, a qualquer momento, quando o hospedeiro perde a capacidade de manter o bacilo no seu sítio de implantação (FANLO, TIBERIO, 2007).

O diagnóstico destas formas torna-se difícil por várias razões, principalmente pela pobreza de bacilos que, quase sempre acompanha estes quadros, onde a confirmação bacteriológica ocorre somente em 25% dos casos. Outra dificuldade refere-se ao diagnóstico histopatológico, já que a ausência de granulomas em tecidos não exclui a possibilidade da doença e os exames de imagem trazem informações importantes, embora em nenhuma de suas localizações haja padrões radiológicos específicos (BRASIL, 2008).

As apresentações extrapulmonares da tuberculose têm seus sinais e sintomas dependentes dos órgãos e/ou sistemas acometidos. De acordo com o manual de controle da TB do Ministério da Saúde, os principais sítios da TBEP diagnosticados são: pleural, linfática/ganglionar, osteoarticular, geniturinária, intestinal, peritoneal, pericárdica, SNC, ocular e cutânea, embora praticamente qualquer local do organismo possa ser afetado pela doença (BRASIL, 2011; LOPES *et. al.*, 2006).

No mundo (Figura 5), a tuberculose extrapulmonar (TBEP) representou 16% dos 7,1 milhões casos, já no Brasil, apresenta a taxa de 15,1%; variando de 2,1% no sistema nervoso, 4,9% miliar até 1,6% em outros órgãos (WHO, 2020; WHO, 2018).

Figura 5 - Porcentagem de casos extrapulmonares entre casos novos e recidivos, em 2019



Fonte: WHO (2020).

## 2.2.2 Formas Extrapulmonar da Tuberculose

- **Pleural:** É uma forma comum de tuberculose extrapulmonar, representando cerca de 20% dos casos, também os mais comuns em indivíduos HIV soronegativos e à principal causa de derrame pleural. A pleura pode ser atingida pelo bacilo causador da tuberculose por via hematogênica, podendo surgir também como manifestação de hipersensibilidade ao bacilo. Outra possibilidade do envolvimento pleural ocorre quando, por via direta, um foco pulmonar caseoso rompe-se na cavidade pleural. Manifesta-se através de febre, astenia e emagrecimento, dor torácica do tipo pontada, podendo ainda haver tosse seca persistente, irritativa e dispneia (GOMES, 2013; CAPONE *et al.*, 2006; RAMIREZ-LAPAUSA, MENENDEZ-SALDANA, NOGUERADO-ASENSIO, 2015).
- **Pericárdica:** Ocorre secundariamente à disseminação hematogênica. Na maioria dos casos, a lesão ocorre por contigüidade, a partir de tuberculose dos gânglios mediastinais ou mais raramente de um foco pulmonar adjacente. e não se associa à tuberculose pulmonar. Geralmente é acompanhada por tuberculose em outro local tem apresentação clínica subaguda, apresentando como principais sintomas a dor

torácica, tosse seca, dispneia podendo haver febre, emagrecimento, astenia e tonteira. . Muitas vezes, a dor não se manifesta como a dor pericárdica clássica. (BRASIL, 2011; RAMIREZ-LAPAUSA, MENENDEZ-SALDANA, NOGUERADO-ASENSIO, 2015; CAPONE *et al.*, 2006).

- Ganglionar: É uma das formas mais frequente da tuberculose extrapulmonar em pacientes HIV soropositivos, adultos jovens e crianças (RAMIREZ-LAPAUSA; MENENDEZ-SALDANA; NOGUERADO-ASENSIO, 2015). Atualmente, apesar de haver exceções, a forma ganglionar indica imunodeficiência, notadamente relacionada à AIDS. A tuberculose ganglionar decorre da progressão dos focos bacilares, com aumento subagudo, indolor e assimétrico das cadeias ganglionares da cervical anterior e posterior, com leve predomínio à direita e também a supraclavicular. O quadro clínico costuma ser insidioso, com febre e emagrecimento e a involução espontânea é frequente (BRASIL, 2011; LOPES *et al.*, 2006)
- Urogenital: a tuberculose pode afetar principalmente o sistema urinário, com infecção direta no rim e/ou no trato urinário. É mais frequente em adultos jovens e do sexo masculino, raramente é acompanhada de acometimento pulmonar, porém, de 8 a 10% dos pacientes com a forma pulmonar podem desenvolver a forma renal. No sistema geniturinário, o rim, o epidídimo e a próstata são os locais do início da infecção, podendo os outros órgãos geniturinários ser afetados por disseminação ascendente ou descendente. Normalmente, a doença desenvolve-se a partir da evolução de focos resultantes da disseminação hemática da primoinfecção, que permaneceram quiescentes por muitos anos (FANLO, TIBERIO, 2007; LOPES *et al.*, 2006).
- Osteoarticular: considerada uma das mais antigas formas da doença, onde múmias egípcias e esqueletos incas apresentavam lesões atribuídas ao bacilo de Koch (CAPONE *et al.*, 2006). É mais comum em crianças (10% a 20% das lesões extrapulmonares na infância) ou em pessoas na faixa etária de 40-50 anos (GOMES, 2013; BRASIL, 2011). A invasão óssea pelo bacilo ocorre por via hematogênica, comprometendo principalmente as vértebras, metáfises dos ossos longos e grandes articulações (quadril, joelho e tornozelo). A destruição do disco intervertebral, o envolvimento do corpo vertebral e a formação de abscesso frio

caracterizam a espondilite tuberculosa, também chamada “Mal de Pott” (CAPONE *et al.*, 2006).

- Sistema Nervoso Central: É responsável por 3% dos casos de TB em pacientes HIV soronegativos e por até 10% dos casos em pacientes HIV soropositivos (BRASIL, 2011). É a forma mais grave da doença, seja no que diz respeito à morbidade e à mortalidade. Inclui o acometimento das meninges, do parênquima cerebral e da medula espinhal. Quase sempre é o resultado da disseminação hemática de bacilos a partir de foco localizado em outra parte do corpo. O prognóstico destas formas está estritamente relacionado com a precocidade do diagnóstico e instalação adequada do tratamento (CAPONE *et al.*, 2006).
- Entérica: Embora bastante raro, ocorre principalmente no intestino, resultante da disseminação via hematogênica ou da deglutição de escarro rico em bacilos. Com o advento da pasteurização, tornou-se erradicado a tuberculose transmitida por via digestiva, principalmente do *Mycobacterium bovis*, que desempenhava papel importante na patogenia da doença. Clinicamente, a evolução costuma ser insidiosa, embora possa adquirir caráter agudo em consequência de obstrução ou de perfuração intestinal (CAPONE *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2006).
- Cutânea: Em sua grande maioria, é uma manifestação secundária da doença, podendo haver uma variação de 0,06-2,4% do número de consultas médicas em dermatologia, de acordo com várias séries publicadas. Dependendo do estado imunológico do paciente, pode-se apresentar como: úlceras, vegetações, nódulos e hiperqueratose, podendo ser divididas em três grupos: formas multibacilares, paucibacilares e reativas (LOPES *et al.*, 2006).
- Outras Formas: também a tuberculose pode se localizar de outras formas: ocular, laríngea, entre outras.

### 2.3 Diagnóstico da Tuberculose

A tuberculose pode acometer uma série de órgãos e/ou sistemas, como já descrito. A forma pulmonar é a mais frequente e a mais relevante para a saúde pública, pois os casos bacilíferos, são responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão. Pode se apresentar na forma pulmonar como primária, pós-primária (ou secundária) ou miliar e na forma

extrapulmonar, onde seus sinais e sintomas dependem dos órgãos e/ou sistemas acometidos (BRASIL, 2011).

Apesar dos intensos esforços dos órgãos envolvidos no controle da tuberculose, há tempos verifica-se que os números de casos não reduzem. Segundo a Organização Mundial de Saúde, um laboratório local pode realizar de 2 a 20 baciloscopias/dia e atender uma população de 100.000 habitantes e, é necessário ao menos um laboratório que realize cultura para uma área com população de 500.000 habitantes. A cultura e o teste de sensibilidade serão realizados pelo laboratório de referência, porém se faz necessário uma integração com os laboratórios locais, enviando as amostras o mais rápido possível (BRASIL, 2008).

O diagnóstico em fase precoce da tuberculose é de suma importância para o início do tratamento, refletindo diretamente no controle individual da doença e, conseqüentemente, para ações de saúde pública voltada à prevenção da transmissão da tuberculose (CHENG; YEW; YUEN, 2005). Poder contar com laboratórios de microbiologia clínica capazes de identificar rapidamente as micobactérias por meio de microscopia e cultura podem elucidar a suspeita clínica. Apesar do exame de escarro ser rápido e custo-efetivo, tem baixa sensibilidade e especificidade, particularmente em amostras paucibacilares, e a cultura, embora seja considerado o padrão-ouro em razão de sua alta sensibilidade, requer várias semanas para produzir um resultado (LAWN; ZUMLA, 2011).

### 2.3.1 Baciloscopia

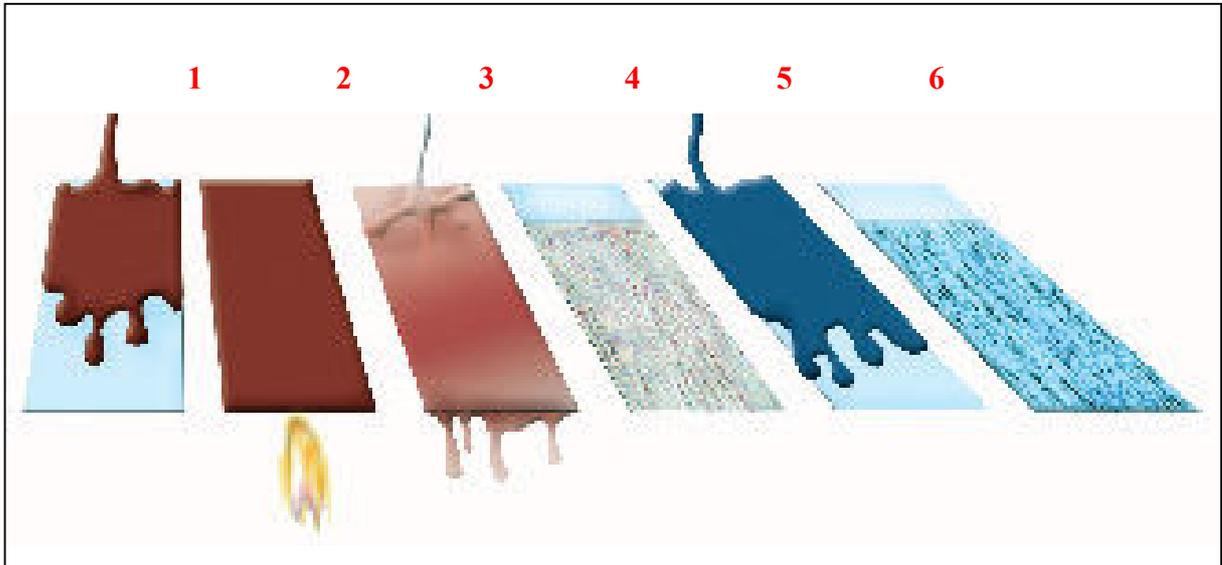
A baciloscopia, que consiste na pesquisa de Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR) em um esfregaço de amostra clínica e corado pelo método de Ziehl-Neelsen, é um método de simples execução e continua sendo importante no diagnóstico da tuberculose, por ser de baixo custo e capaz de detectar os sintomáticos respiratórios e também a presença do *M. tuberculosis* em materiais de prováveis sítios da doença. Essa técnica visa detectar os casos infecciosos de tuberculose pulmonar, para acompanhar a eficácia do tratamento através da redução bacilar e/ou negatificação do escarro, porém, apresenta uma baixa sensibilidade quando comparada com a cultura.

A baciloscopia direta deve ser solicitada aos pacientes que apresentem:

- critérios de definição de sintomático respiratório (exame de escarro);
- suspeita clínica e/ou radiológica de TB pulmonar, independentemente do tempo de tosse (exame de escarro);
- suspeita clínica de TB extrapulmonar (exame em materiais biológicos diversos) (BRASIL, 2011).

A coloração pelo método de Ziehl-Neelsen segue os passos, conforme demonstrados na Figura 6.

Figura 6 - Etapas da coloração de Ziehl-Neelsen



Fonte: BRASIL (2001).

Observe que:

- na etapa 1, adiciona-se a fucsina sobre o esfregaço previamente fixado;
- na etapa 2, faz-se o aquecimento até a emissão de vapores, por três vezes, para facilitar a penetração da fucsina;
- na etapa 3, derrama-se o corante na pia e lava-se o esfregaço com água;
- na etapa 4, faz-se a descoloração com álcool-ácido e lava-se o esfregaço com água. Apenas os BAAR presentes no esfregaço reterão a fucsina;
- na etapa 5, adiciona-se azul de metileno;
- na etapa 6, lava-se o esfregaço com água e faz-se a leitura.

Se houver BAAR na amostra eles ficarão vermelhos devido à retenção da fucsina e serão visualizados microscopicamente. O fundo azul no esfregaço faz o contraste para essa visualização (BRASIL, 2001).

Para todas as amostras clínicas extrapulmonares ou pulmonares que não escarro deve ser feita a baciloscopia para pesquisa de BAAR (exceto sangue e medula óssea), sendo obrigatória a realização da cultura ou mesmo fazer o uso de testes moleculares. Apesar de essa técnica ser essencial, atualmente é insuficiente diante do aparecimento de cepas

multirresistentes e de formas características de apresentação da tuberculose no hospedeiro, induzidas pela presença concomitante do vírus HIV, que potencializa a agressividade e o poder destrutivo das micobactérias (BRASIL, 2013; BRASIL, 2008).

Sendo assim, para essas amostras extrapulmonares e outras pulmonares que não escarro, se faz necessário à utilização da cultura, por ser um método mais sensível, colocar em evidência os bacilos viáveis presentes em escassa quantidade, permite também a identificação das espécies, a realização do teste de sensibilidade e possibilitará posteriores desdobramentos técnico-científicos mais sofisticados, como a tipificação dos bacilos (BRASIL, 2001; BRASIL, 2008).

Para todas as amostras clínicas extrapulmonares e pulmonares que não seja escarro, deve ser feita a baciloscopia para pesquisa de BAAR (exceto sangue e medula óssea), sendo obrigatória a realização da cultura. Para essas amostras clínicas citadas, a baciloscopia, na sua grande maioria tem como resultado negativo. O LACEN/MS realiza a baciloscopia de todas as amostras, conforme preconizado pelos manuais do Ministério da Saúde (BRASIL, 2013), porém, como não era objetivo deste trabalho, não foi avaliada a presença de BAAR nas amostras, para não correr o risco de insuficiência de material para semeadura nos três meios de cultura.

### 2.3.2 Cultura

A primeira medida que se faz necessário para a adoção de tecnologias mais avançadas é a ampla utilização do método de cultura, que possibilitará posteriores desdobramentos técnico-científicos mais sofisticados, como a tipificação dos bacilos, a resistência bacilar, bem como a realização de várias técnicas moleculares (BRASIL, 2008).

A maioria dos casos de tuberculose é a forma pulmonar e, para esse material a cultura é capaz de detectar de 10 a 100 bacilos cultiváveis por mililitros de escarro. É o método de referência (padrão-ouro), podendo adicionar 20% de casos não confirmados pela baciloscopia. Para que isso ocorra, deve-se investir na capacitação para melhorar a competência técnica dos profissionais, da organização e gerência dos gestores municipais; responsáveis diretos pelo controle da tuberculose e, principalmente, da vontade política (BRASIL, 2008).

A cultura é um método de elevada especificidade e sensibilidade no diagnóstico da TB e diante dessa capacidade, segundo as normas do PNCT devem ser realizadas para:

- a) sintomáticos respiratórios com suspeita de TB e baciloscopia repetidamente negativa;

- b) casos suspeitos de TB com amostras paucibacilares e/ou dificuldades de coleta da amostra (crianças, populações indígenas);
- c) casos suspeitos de TB extrapulmonar e pulmonar que não escarro;
- d) pacientes portadores do HIV;
- e) pacientes com indicação de retratamento após falência ao esquema I, TB multirresistente (TBMR) e recidiva da doença ou reinício de tratamento após abandono;
- f) casos suspeitos de infecções causadas por MNT;
- g) casos suspeitos que vivem em instituições fechadas;
- h) estudos epidemiológicos como atividades de vigilância, para determinar a prevalência da resistência (BRASIL, 2013).

Os métodos clássicos para cultura de micobactérias utilizam técnicas de semeadura da amostra em meios de cultura sólidos. Os meios de cultura mais comumente utilizados são os sólidos à base de ovo, Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh. Têm a vantagem de serem os de menor custo e de apresentarem um índice de contaminação menor. A desvantagem do meio sólido é o tempo de detecção do crescimento bacteriano que varia de 14 a 30 dias, podendo se estender por até oito semanas (BRASIL, 2008).

#### 2.3.2.1 Pré-tratamento das amostras

As amostras, quando provenientes de sítios não estéreis, como o escarro, urina, secreções, lavado brônquico, lavado gástrico e fragmento de tecido cutâneo, se fazem necessário realizar um tratamento nas mesmas. Já as amostras consideradas não contaminadas são aquelas provenientes de sítios estéreis, tais como: LCR, líquidos (pleural, sinovial, peritonal, pericárdico), fragmentos de órgãos, sangue e medula óssea, não é necessário descontaminar. Esse tratamento se faz quanto ao uso ou não de centrifugação e/ou maceração (BRASIL, 2008).

Para amostras não estéreis, utiliza-se agentes químicos (ácidos, bases) que liberam as micobactérias do muco e da fibrina (fluidificando) ou dos tecidos em que estão incluídos, homogeneizando a amostra clínica e eliminando outros microrganismos da amostra, fazendo que não ocorra competição pelos nutrientes contidos nos meios de cultura. A escolha do agente fluidificante-descontaminante e do meio de cultura está relacionada com o tipo de amostra clínica, normalmente sendo utilizado na rotina o Hidróxido de Sódio (NaOH), N-acetil-L-cisteína (NALC) e Ácido Oxálico (BRASIL, 2008).

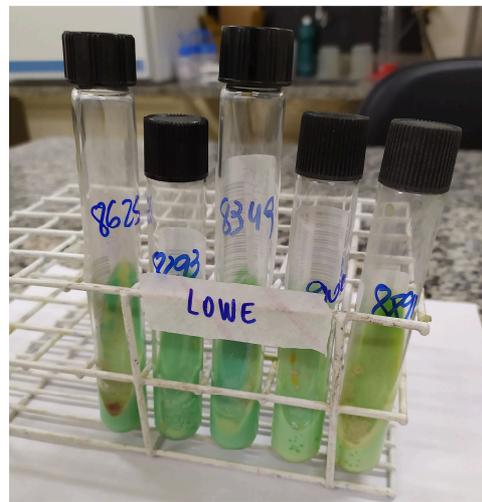
### 2.3.2.2 Método Löwenstein-Jensen

O meio foi descoberto pelo patologista austríaco Ernst Löwenstein (1878-1950) e do químico dinamarquês Kai Arne Jensen (1908-1992) apresenta na sua composição os seguintes elementos: fosfato monopotássico anidro, sulfato de magnésio, glicerol, água destilada, ovos frescos e solução aquosa de verde malaquita. Inocula-se 0,2 mL do material clínico tratado no tubo contendo meio de LJ. A incubação deve ser feita em estufa 37° C, mantendo os tubos na posição horizontal com as tampas semiabertas, ou seja, um pouco desrosqueadas até que o inóculo esteja seco e depois colocar na vertical e apertar as tampas (BRASIL, 2013).

Figura 7 - Meio Löwenstein-Jensen



Fonte: Arquivo pessoal



Fonte: Arquivo pessoal

As culturas devem ser observadas duas vezes nas duas primeiras semanas e uma vez nas semanas seguintes até completar oito semanas. Deve-se anotar a pigmentação e quantidade das colônias, bem como a presença de fungos e outras bactérias e a apresentação de mais de um tipo de colônias de micobactérias. Havendo crescimento, faz-se uma lâmina para baciloscopia, para confirmar a presença de BAAR e da presença de corda ou grumos aglomerados lineares, característico de *M. tuberculosis* (BRASIL, 2013).

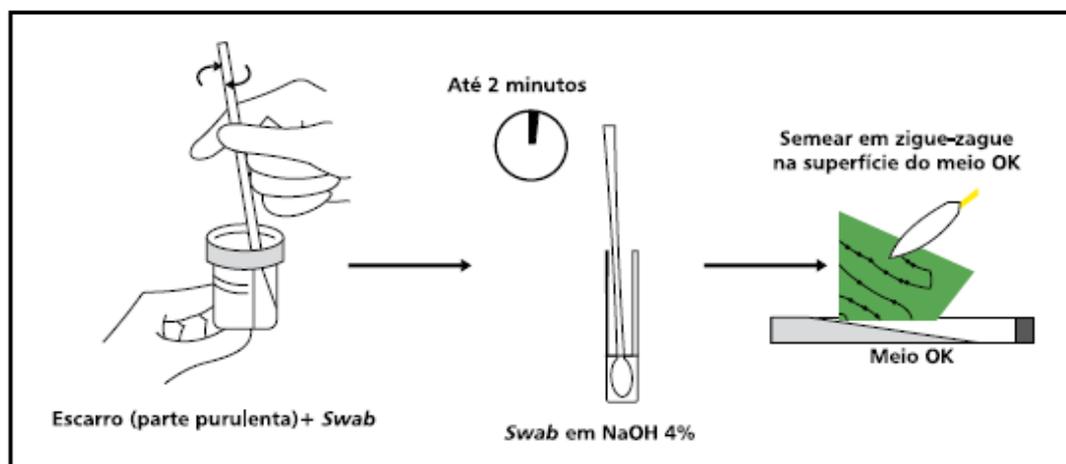
### 2.3.2.3 Método Ogawa-Kudoh

O meio foi descrito, inicialmente por Kudoh e Kudoh (1974) e apresenta na sua composição os seguintes elementos: fosfato monopotássico anidro, citrato de magnésio, glutamato de sódio, glicerol, água destilada, ovos frescos e solução aquosa de verde malaquita a 2%, sendo levemente acidificado pH 6,4 (BRASIL, 2008).

Esse método é recomendado para a utilização em laboratórios de menor complexidade, pois não requer o uso de centrífuga, é de execução simples, rápida e fácil. Utiliza-se o NaOH 4% como agente descontaminante, sendo indicado para amostras de escarro espontâneo. Para amostras paucibacilares, não foi encontrado publicações demonstrando resultados que comprovem sua eficiência.

Utiliza *swab* de algodão que, após ser embebido na parte purulenta do escarro ou em outras amostras não estéreis, é colocado em NaOH 4% por até dois minutos. O material é semeado espalhando com o *swab* sobre a superfície do meio.

Figura 8 - Fluxograma de semeadura no meio Ogawa-Kudoh



Fonte: BRASIL (2008).

A incubação é a 37°C em estufa, examinando as culturas duas vezes nas duas primeiras semanas e uma vez nas semanas seguintes, até completar oito semanas, anotando o número e a pigmentação das colônias. O processo de análise é semelhante ao LJ, anotando pigmentação, quantidade das colônias, presença de contaminantes e até mesmo outras micobactérias. Após toda essa análise, realiza-se a baciloscopia para confirmar a presença de BAAR e da presença de corda ou grumos aglomerados lineares (BRASIL, 2013).

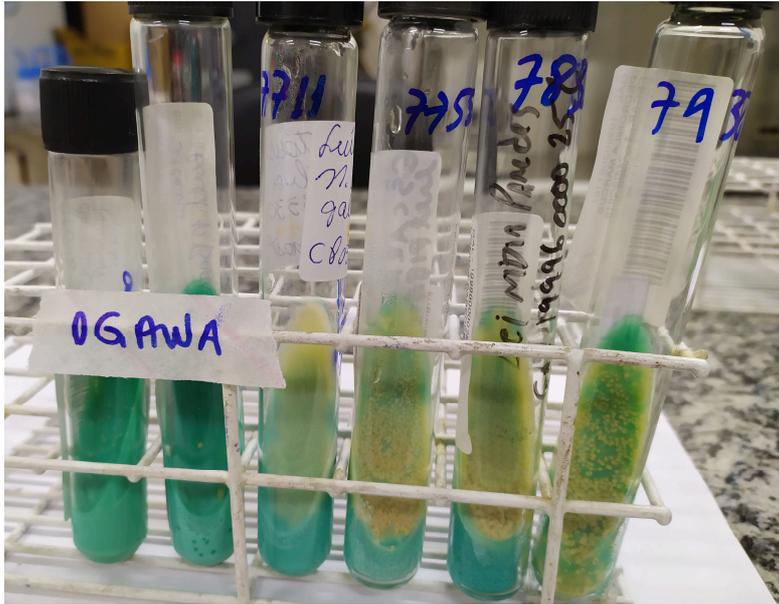
A partir da confirmação de BAAR, realiza-se o teste rápido imunocromatográfico, que detecta o antígeno específico de *Mycobacterium tuberculosis* MTP64, para confirmação do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Na falta do referido teste, semeia-se a amostra positiva no meio de Lowestein-Jensen com ácido-nitrobenzóico, testando sua sensibilidade. Se não houver crescimento, considera-se sensível, sendo o resultado positivo para o complexo do *M. tuberculosis* e se houver crescimento o resultado é positivo para MNT (micobactéria não tuberculose).

A partir de 1999, o LACEN/MS passou a produzir o meio sólido OK e fornecê-lo aos laboratórios do interior do Estado de Mato Grosso do Sul. Inicialmente, visava atender a população indígena sul-mato-grossense, com suspeita de tuberculose, passando a ser realizada no Hospital Porta da Esperança (Dourados/MS), onde funcionava o serviço de referência para essa população, contribuindo entre os anos de 1999 a 2001 no aumento de 34% o número de casos de tuberculose diagnosticados (CUNHA, 2014).

O LACEN/MS tem como uma de suas metas, promover a descentralização para os municípios, dos serviços e as ações em saúde relativas ao diagnóstico da tuberculose e o método de OK, devido a sua praticidade e facilidade, foi descentralizado e vem sendo executado a semeadura das amostras nos laboratórios municipais.

Nas localidades onde possuem estufa, as amostras permanecem até o início do crescimento e, depois são enviadas ao LACEN/MS para identificação e teste de sensibilidade, caso necessário. Em localidades sem estufa, semeiam-se as amostras e são enviadas ao LACEN/MS, para posterior crescimento. Essa atividade favoreceu enormemente a expansão da realização das culturas, beneficiando os suspeitos com a cultura para micobactérias, subsidiando os profissionais médicos no diagnóstico (BRASIL, 2011; BRASIL, 2008).

Figura 9 - Meio Ogawa-Kudoh



Fonte: Arquivo pessoal



Fonte: Arquivo pessoal

#### 2.3.2.4 Método MGIT 960® (*Mycobacteria Growth Indicator Tube* - Becton & Dickinson)

Com o avanço tecnológico, surgiu o MGIT960® (*Mycobacteria Growth Indicator Tube* - Becton & Dickinson) e, no ano de 2005, foi registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, passando a ser utilizado pelo LACEN/MS.

Trata-se de um método totalmente, método totalmente automatizado e não radiométrico, considerado padrão ouro, pois, além de demonstrar performance similar ao método de proporções, permite conhecer o resultado em tempo médio de sete dias. Apresenta elevada concordância entre a performance do MGIT960® e os três métodos, até então considerados de referência para o diagnóstico de tuberculose e para aquelas cepas resistentes (GIAMPAGLIA *et al.*, 2007). O MGIT 960® está validado e aprovado pela Anvisa para os seguintes fármacos: estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol (BRASIL, 2011).

O sistema comercial BBL™ MGIT™ (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*), de leitura tanto manual como automatizada consiste em um meio líquido (Middlebrook 7H9), acrescido de antibióticos e enriquecimento de suplementos, acondicionado em um tubo contendo um sensor fluorescente sensível ao oxigênio, composto de rutênio pentahidratado em uma base de silicone (BRASIL, 2008).

A preparação dos meios de cultura MGIT e a realização do teste de sensibilidade aos fármacos (TS) seguem as instruções do fabricante, consistindo no preparo de um tubo de MGIT com PNB e quatro tubos com as drogas SIRE (S=SM, I=INH, R=RMP e E=EMB).

Diariamente o aparelho BACTEC MGIT 960 (Figura 10), através da fluorescência, indica os resultados de resistência e sensibilidade das drogas a cada isolado bacteriano testado (BRASIL, 2008).

Figura 10 - MGIT 960® (*Mycobacteria Growth Indicator Tube* - Becton & Dickinson



Fonte: Arquivo pessoal



Fonte: Arquivo pessoal

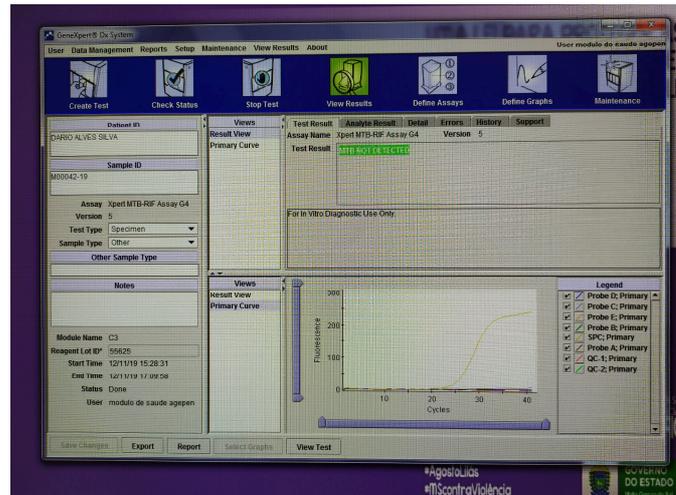
### 2.3.3 Genexpert

Vistos os empecilhos no diagnóstico da TB, em tempos recentes, atenção tem sido dedicada à amplificação de ácidos nucleicos como ferramenta diagnóstica devido à sua rapidez, sensibilidade e especificidade. Um dos mais recentes, o GeneXpert, utiliza um real-time semi-nested PCR (Reação em cadeia da Polimerase) para sequenciar o gene *rpoB* do MTB e, juntamente, determinar resistência à Rifampicina, feito de forma automatizada com resultado em duas horas. Em um estudo recente, em 521 amostras de sítios extrapulmonares, o GeneXpert (Figura 11) mostrou uma sensibilidade de 77,3% e uma especificidade 98,2% (HILLEMANN, *et al.*, 2011).

Figura 11 - GeneXpert



Fonte: Arquivo pessoal.



Fonte: Arquivo pessoal.

## 2.4 Acurácia dos métodos de cultivo nos meios LJ, OK e MGIT para amostras de escarro

Diversos estudos foram conduzidos demonstrando a eficiência do método Ogawa-Kudoh, tendo como material clínico exclusivamente o escarro. Teve início com o trabalho intitulado: “Uma técnica simples para cultivar bacilos da tuberculose”, onde se realizou um estudo comparativo entre o método Ogawa e o método Lowenstein-Jensen (recomendado pela OMS), em que das 512 amostras de escarro, verificou-se que o cultivo no OK apresentou eficácia comparável ao recomendado pela OMS, tendo a vantagem da execução mais fácil e por não necessitar de estrutura laboratorial (KUDOH; KUDOH, 1974).

Segundo Takao *et al.* (2005), no trabalho com o objetivo de avaliar a utilização dos métodos de cultivo de escarro, no diagnóstico da tuberculose pulmonar, utilizando 459 amostras de escarro, concluiu que os métodos avaliados (Petroff, Petroff-R e O-K) apresentaram eficácia de isolamento de micobactérias. A comparação de positividade e no processo de descontaminação das amostras, para o isolamento de *M. tuberculosis* e micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* não mostrou diferença estatística quando comparado ao padrão ouro Petroff.

Outro estudo realizado recentemente comparou o desempenho do método de OK ao de Petroff modificado no diagnóstico da tuberculose pulmonar. Foram analisadas 205 amostras de escarro com suspeita clínica ou controle de TB atendidos em um hospital público. Os autores concluíram não haver discordâncias significativas entre os métodos, tanto nas comparações de pares de resultados ( $p=0,549$ ), como na taxa de contaminação das culturas ( $p=0,065$ ). O grau de concordância das técnicas foi considerado excelente ( $K=0,877$ ), e o OK

em relação ao Petroff modificado, apresentou 90,4% de sensibilidade, 96,6% de especificidade, 94,3% de valor preditivo positivo e 94,2% de valor preditivo negativo (COSTA *et al.*, 2018).

Em outro estudo mais amplo, com a finalidade de cooperação, envolvendo quatro Estados e quatro grupos de pesquisadores, analisaram o método de cultura OK, em duas fases, sendo a primeira, comparando OK com LJ com 569 amostras e a segunda com 19.163 amostras de quatro Estados brasileiros (Espírito Santo, Rio Grande do Sul, São Paulo e Mato Grosso do Sul). A primeira fase apresentou sensibilidade de 94,8% e especificidade de 99,8% e, na segunda fase, houve um incremento em 29,8% nos casos de baciloscopia negativa, indicando que a cultura de OK deve se tornar um padrão para o diagnóstico de TB nessas regiões (PALACI *et al.*, 2013).

O uso do método OK no LACEN/MS iniciou-se em 1999, sendo utilizado em população indígena e, posteriormente, contemplar populações remotas, sob alto risco de adoecimento e para municípios prioritários, tanto para amostras pulmonares e extrapulmonares, possibilitando o diagnóstico precoce de casos suspeitos, permitindo descartar suspeitas das doenças e proporcionando a realização de testes de sensibilidade (CUNHA *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2018).

Estudo realizado com o objetivo de verificar o desempenho dos meios de cultura Ogawa-Kudoh (OK) e *mycobacteria growth indicator tube* (MGIT – Becton & Dickinson), sendo as amostras semeadas nos dois meios. Das 490 culturas realizadas, 45 (9,2%) foram positivas no meio OK e 58 (11,8%) no MGIT. O percentual de contaminação do meio OK foi 1,2% e 0,2% no MGIT. O acréscimo ao diagnóstico pela cultura no OK foi de 11 (17,7%) e no MGIT de 20 (28,2%). Sendo assim, concluiu-se que a concordância/confiabilidade dos resultados foi de 95,2% (n=483), apesar de constatar que o meio MGIT apresentou melhores resultados em relação ao percentual de positividade, à rapidez no diagnóstico, à taxa de contaminação e ao acréscimo do diagnóstico da cultura, quando comparado com o meio OK (PEDRO *et al.*, 2011).

Ressalta-se que existem apenas seis estudos de escala relativamente pequena na literatura internacional, que avaliaram o método OK, comparando-o com o LJ (KOTHADIA, SENGUPTA, 1982; JASPE *et al.*, 2009; RIVAS *et al.*, 2010; PALACI *et al.*, 2013; JOBARTEH *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2018). Esses estudos foram realizados na Venezuela, Brasil, Gâmbia, Uruguai e Índia, todos eles em amostras de escarro e, em todos os estudos, ambos os métodos apresentaram um rendimento diagnóstico semelhante (FRANCO-SOTOMAYOR *et al.*, 2020).

Todos os estudos também concordaram que o método OK para cultivar micobactéria é barato, fácil de executar, mesmo em locais com pouca estrutura laboratorial e que deve substituir o LJ (KOTHADIA; SENGUPTA, 1982). No entanto, a maioria dos estudos foi realizada com um número relativamente pequeno de amostras de escarro ou com baixa positividade, como o realizado no Uruguai (784 amostras e 25 positivas para o *M. tuberculosis*) (RIVAS *et al.*, 2010).

Apenas um estudo em larga escala, comparou o método OK com o LJ em 2.287 amostras pulmonares e 685 extrapulmonares em um universo com 20% de positividade para o *M. tuberculosis*, com uma amostra de cada paciente. A positividade em um ou ambos os métodos foi 24,6% (718 / 2.915) onde 685 (95,5%) foram detectados pelo método LJ e 698 (97,4%) pelo método OK, com rendimento significativamente maior para o OK (FRANCO-SOTOMAYOR *et al.*, 2020).

Entre 625 pacientes com tuberculose pulmonar, foram diagnosticados pelo LJ 604 (96,6%) e 614 (98,2%) pelo OK, com diferença significativa (p 0,002). No que diz respeito às amostras clínicas extrapulmonares 93/685 foram positivas, onde o método LJ diagnosticou 88,2% (82/93) e o OK diagnosticou 90,3% (84/93), sem diferença significativa entre os métodos (p 0,668) (FRANCO-SOTOMAYOR *et al.*, 2020).

Os autores concluíram que o método OK detectou a presença de *M. tuberculosis* em 40,7% das amostras, após duas semanas de incubação, enquanto nenhum crescimento foi observado no LJ, a taxa de contaminação pelo método O-K ficou abaixo de 10% previstos, a quantidade de material para o OK é oito vezes menor, sem prejuízo na positividade. O método OK também é adequado para laboratórios tradicionais com alto volume de amostras, aliviando a carga de trabalho, eliminando a demorada etapa da centrifugação e acelerando o diagnóstico em mais de duas semanas, para a maioria das amostras (FRANCO-SOTOMAYOR *et al.*, 2020).

A simplicidade do método O-K permite o cultivo rápido e seguro sem a presença de uma estrutura de laboratório, sendo adequado para áreas rurais e em países com populações negligenciadas e com alto risco de tuberculose (ROMERO-SANDOVAL *et al.*, 2007; MAES *et al.*, 2008; FRANCO-SOTOMAYOR *et al.*, 2019). Este método passou a ser o único utilizado no Equador, na rotina de todos os laboratórios de TB a partir dos achados de Franco-Sotomayor *et al.* (2020).

No Brasil, um único estudo realizado por Boffo *et al.* (2000), em 102 amostras clínicas de sítios extrapulmonares de 74 pacientes com AIDS, foi na cidade de Rio Grande/RS, com objetivo de enfatizar a importância do diagnóstico da tuberculose extrapulmonar. Os materiais

analisados foram: biópsia hepática, biópsia ganglionar, líquido ascítico, aspirado de medula óssea, biópsia de medula óssea, biópsia de pele, biópsia de nódulo em membro inferior, líquido de abcesso anorretal, macerado de lesão de pele, urina e líquido sinovial.

A positividade na cultura em OK foi 12,7%, incluindo biópsia ganglionar, biópsia hepática, líquido ascítico e líquido pleural, sendo que o melhor rendimento observado foi para a biópsia ganglionar. Os autores concluíram que a cultura foi o método de eleição para o diagnóstico da forma extrapulmonar de tuberculose. No entanto, tratava-se de um estudo pequeno e nenhum outro foi realizado, apontando a eficácia do método OK para diagnóstico da tuberculose extrapulmonar (BOFFO *et al.*, 2000).

Frente às inúmeras vantagens do método de OK para diagnóstico da tuberculose, é importante destacar esta investigação em nosso meio, especialmente para o diagnóstico da tuberculose em materiais paucibacilares, incluindo extrapulmonares, além de compará-los ao desempenho dos métodos de LJ e MGIT.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Analisar o desempenho do método Ogawa-Kudoh em comparação com os métodos Lowenstein-Jensen e MGIT para diagnóstico da tuberculose pulmonar e extrapulmonar em materiais paucibacilares recebidos pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Verificar a positividade das culturas de micobactérias por métodos e por tipo de material biológico semeado;
- Avaliar sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e negativo, considerando Löwenstein-Jensen e MGIT como referência;
- Analisar a concordância entre os métodos.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Modelo, local e período de estudo**

Estudo transversal, conduzido no LACEN/MS, para o diagnóstico da tuberculose em Mato Grosso do Sul, no período de fevereiro de 2017 a março de 2018.

### **4.2 População do estudo e abrangência**

Todas as amostras de suspeitos de TB que chegaram ao LACEN/MS, que cumpriram os requisitos do serviço de triagem e foram encaminhados ao setor de micobacteriologia. Para o estudo, foram incluídas todas as amostras, exceto escarro, oriundas dos serviços de saúde, independente da quantidade de material, forma de coleta, armazenamento, transporte e tempo transcorrido desde a coleta do material. Não foram incluídos os materiais insuficientes para semeadura em pelo menos um dos três meios de cultura.

### **4.3 Definição adotada para as amostras do estudo**

Amostras paucibacilares foram consideradas aquelas oriundas de material pulmonar, mas coletada através de procedimentos hospitalares, além das amostras de sítios extrapulmonares.

### **4.4 Procedimentos para a pesquisa de BAAR, descontaminação, semeadura, incubação e leitura das amostras**

Para a realização de cada uma das etapas, foram utilizados os Procedimentos Operacionais Padrão (POP) elaborados pelo LACEN/MS, levando em consideração as recomendações do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008), conforme pontuados abaixo:

#### 4.4.1 POP para pesquisa de BAAR em amostras paucibacilares

- as amostras que forem de sítios estéreis, fazer o esfregaço ou “imprint” e aguardar secar em temperatura ambiente. Para as amostras que necessitem do processo de descontaminação através de Petroff ou NaOH 4%, realiza-lo primeiramente e colocar 2 gotas do sedimento no centro da lâmina, preparar um esfregaço com a ponta da pipeta e realizar a coloração de Ziehl-Neelsen, conforme descrito no item 2.3.1.

#### 4.4.2 POP para descontaminação

- somente foi utilizado para amostras de sítios não estéreis, utilizando agentes químicos para homogeneizar a amostra clínica e eliminar outros microrganismos da mesma. Realizou-se o Petroff para semeadura nos meios LJ e Middlebrook 7H10 (meio líquido). Para semear no meio OK, utilizou-se Hidróxido de Sódio (NaOH) 4%.
  - Petroff
    - transferir a amostra para o tubo de centrífuga e adicionou o mesmo volume de solução de NaOH 4%, homogeneizando vigorosamente;
    - deixou 15 min à temperatura de 37°C e adicionou o mesmo volume de água destilada estéril;
    - gotejou a solução neutralizante até mudar a cor de rosa para amarelo âmbar;
    - centrifugou a 3.000 rpm por 15 minutos, desprezou o sobrenadante e homogeneizou o sedimento, estando pronto para semeadura (BRASIL, 2013).
  - Hidróxido de Sódio (NaOH) 4%
    - em um tubo contendo 3 ml de NaOH 4%, com auxílio de um *swab*, imergiu na amostra a ser pesquisada *Mycobacterium tuberculosis* e deixou em repouso por 2 min. Estando pronto para realizar a semeadura após esse tempo, não podendo extrapolar.

#### 4.4.3 POP para semeadura

- nem todas as amostras puderam ser semeadas em todos os meios de cultivo, pois algumas possuem restrições, tais como: sangue e amostras de medula, e não podem ser semeadas no MGIT (BRASIL, 2013).

- Cultura em Lowentein-Jensen (LJ):
  - amostras oriundas de sítios estéreis foram semeadas de forma direta. Enquanto as amostras que passaram por descontaminação pelo método Petroff, o sedimento foi previamente homogeneizado, e, então, 0,2 ml da amostra foram inoculadas em meio sólido (LJ).
- Cultura em MGIT: *Mycobacteria growth indicator tube* (Becton & Dickinson):
  - seguiu-se a orientação do fabricante, inoculando 0,5 mL do material tratado no tubo com o meio juntamente com 0,8 mL do suplemento para estimular o crescimento (acompanha o kit) e solução de antibióticos para inativar outras bactérias (acompanha o kit);
- Cultura em Ogawa-Kudoh:
  - após aguardar dois minutos imerso em NaOH 4%, pressionou o *swab* contra a parede do tubo para remover o excesso de reagente, realizou-se a semeadura com o próprio *swab* de maneira a distribuir o material sobre a superfície do meio, mediante movimentos rotatórios e em ziguezague de maneira a espalhar bem o inóculo.

#### 4.4.4 POP para incubação

- Lowentein-Jensen:
  - o material foi incubado em estufa a 37°C, mantendo os tubos na posição horizontal, com as tampas um pouco desrosqueadas até que o inóculo esteja seco e, depois, os tubos foram colocados na vertical e as tampas apertadas, por até oito semanas.
- MGIT: *Mycobacteria growth indicator tube* (Becton & Dickinson):
  - o material foi incubado no BACTEC MGIT960, aguardando período máximo de 42 dias. Após a incubação dos tubos no equipamento, a leitura foi realizada automaticamente e os tubos positivos são indicados no visor e na parte frontal da gaveta do equipamento e caso tenha dado alguma mensagem de erro, também é informado nesses locais (BRASIL, 2008).

- Ogawa-Kudoh:
  - o material foi incubado em estufa a 37°C, mantendo os tubos na posição horizontal, com as tampas um pouco desrosqueadas até que o inóculo esteja secos e depois colocados na vertical e apertar as tampas, por até oito semanas.

#### 4.4.5 POP para leitura e interpretação dos resultados

- Lowentein-Jensen:
  - examinaram-se as culturas duas vezes nas duas primeiras semanas e uma vez nas semanas seguintes até completar oito semanas. Anotou-se o número e a pigmentação das colônias, observando a presença de contaminantes (fungos e outras bactérias) e a presença de mais de um tipo de colônias de micobactérias (BRASIL, 2013)
- MGIT: *Mycobacteria growth indicator tube* (Becton & Dickinson):
  - o meio contém um composto fluorescente, que é sensível à presença do oxigênio dissolvido no meio. Os microrganismos respirando ativamente no meio consomem o oxigênio o que ocasiona a emissão da fluorescência e sua detecção pelo equipamento, feito de forma automática pelo software do sistema.
- Ogawa-Kudoh
  - examinaram-se as culturas duas vezes nas duas primeiras semanas e uma vez nas semanas seguintes até completar oito semanas. Anotou-se o número e a pigmentação das colônias, observando a presença de contaminantes (fungos e outras bactérias) e a presença de mais de um tipo de colônias de micobactérias (BRASIL, 2013).

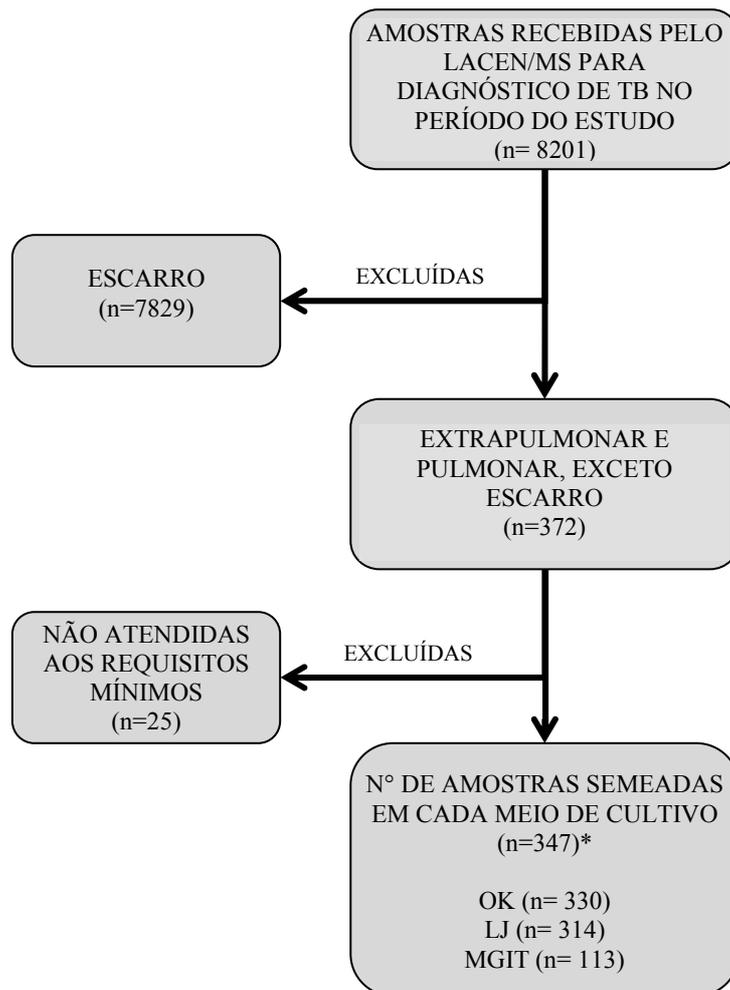
#### 4.5 Organização e análise dos dados

Os resultados de cada amostra foram lançados em planilha Excel para avaliação das frequências dos resultados em cada material e por cada tipo de meio de cultivo utilizado. As análises foram realizadas no programa estatístico SPSS, versão 24.0 e na calculadora *online* “Critical Appraisal – diagnostic test” desenvolvido por DJR Hutchon. Teste do qui quadrado com correção de Bonferroni foi utilizado para comparação de frequências, com um nível de significância de 5%. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor

preditivo negativo (VPN) e acurácia foram avaliados conforme as especificações de Griner *et al.* (1981).

A representação das amostras extrapulmonares e pulmonares, exceto escarro, estão representadas na figura 12 a seguir.

Figura 12 - Fluxograma do número de amostras recebidas e semeadas pelo LACEN/MS de março de 2017 a março de 2018



LACEN/MS: Laboratório Central de Saúde de Pública de mato Grosso do Sul

TB: Tuberculose

OK: meio de cultura de Ogawa Kudoh

LJ: meio de cultura de Löwenstein-Jensen

MGIT: meio líquido - Mycobacteria growth indicator tube

\* as amostras foram submetidas a um ou mais método de cultivo.

Para análises da concordância entre os testes foi utilizado o coeficiente kappa, com intervalo de confiança de 95%, sendo usado nas análises dos parâmetros de acurácia, com a interpretação, conforme demonstrado no Quadro 1, a seguir.

Quadro 1 - Interpretação dos valores do coeficiente kappa:

| <b>Valor de kappa</b> | <b>Interpretação</b> |
|-----------------------|----------------------|
| 0 - 0,19              | Ruim                 |
| 0,20 - 0,39           | Fraca                |
| 0,40 - 0,59           | Moderada             |
| 0,60 - 0,79           | Substancial          |
| 0,80 - 1,0            | Quase perfeita       |

Fonte: Landis e Koch (1977).

#### **4.6 Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o parecer número 2.856.464. (ANEXO)

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de amostras recebidas pelo LACEN/MS (8.201), fez parte do estudo 347 amostras, de origem pulmonar ou extrapulmonar, consideradas paucibacilares, que foram separadas e analisadas considerando o tipo de material. Entre os materiais extrapulmonares, o maior número de amostras foi de líquido cérebro-espinhal (28,2%), seguido por medula óssea (20,5%), fragmentos de tecidos (16,7%) e entre as amostras pulmonares, a secreção traqueal (9,8%) e lavado bronco alveolar (6,9%), conforme tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição por tipo de amostra recebida para cultura de *Mycobacterium tuberculosis*. Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil.

| <b>Tipo de material</b>                   | <b>n (%)</b>       |
|---|--------------------|
| <b>Material Extrapulmonar</b>             |                    |
| Líquido cérebro-espinhal                  | 98 (28,2)          |
| Medula óssea                              | 71 (20,5)          |
| Fragmentos de tecidos (não especificados) | 58 (16,7)          |
| Líquido pleural                           | 21 (6,1)           |
| Urina                                     | 16 (4,6)           |
| Sangue                                    | 12 (3,5)           |
| Linfonodos                                | 6 (1,7)            |
| Lavado gástrico                           | 3 (0,9)            |
| Líquido ascítico                          | 3 (0,9)            |
| Swab de material não especificado         | 1 (0,3)            |
| <b>Subtotal</b>                           | <b>289 (83,3)</b>  |
| <b>Material Pulmonar, exceto escarro</b>  |                    |
| Lavado bronco-alveolar                    | 24 (6,9)           |
| Secreção traqueal                         | 34 (9,8)           |
| <b>Subtotal</b>                           | <b>58 (16,7)</b>   |
| <b>Total</b>                              | <b>347 (100,0)</b> |

O *M. tuberculosis* penetra no organismo pela via respiratória, atinge os pulmões de onde pode disseminar-se e instalar-se em qualquer órgão, seja durante a primo-infecção (quando por condições imunológicas não há manifestação clínica da doença) ou depois desta, a qualquer momento, quando o hospedeiro perde a capacidade de manter o bacilo no seu sítio de implantação (FANLO, TIBERIO, 2007).

Essa capacidade do agente de se instalar em diferentes sítios, fez com que a TBEP seja uma infecção oportunista, comum em pessoas vivendo com HIV/AIDS e outros estados de imunossupressão e seu diagnóstico apresenta um desafio (WHO, 2017).

A apresentação fora do pulmão representou 14% dos 6,4 milhões casos mundialmente, enquanto no Brasil, representa aproximadamente 15,1%; variando de 2,1% no sistema nervoso, 4,9% miliar até 1,6% em outros órgãos (WHO, 2018).

Apesar das formas extrapulmonares não se constituírem em fatores de risco quanto à transmissão, estas formas ganham cada vez mais importância, em virtude do aumento da sua incidência, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento e, devido à epidemia da AIDS. A maioria das formas extrapulmonares acontece em órgãos sem condições adequadas de crescimento bacilar, sendo frequentemente instalação insidiosa e evolução lenta (CAPONE *et al.*, 2006).

As proporções de casos de TBEP, em relação às outras formas clínicas apresentam grande variação entre os diferentes países e, parece ser mais alto naqueles com baixa incidência de TB, como EUA (21%), Itália (32%), Japão (23%) e Austrália (39%) (WHO, 2019). As razões para essas diferenças são desconhecidas, mas podem estar relacionadas a diferentes padrões epidemiológicos e proporções de pessoas com TB, como consequência de infecções recentes (BRAGA *et al.*, 1992).

O diagnóstico da tuberculose extrapulmonar (TBEP) apresenta-se como um grande desafio, devido a sua clínica atípica, apresentando um processo inflamatório e assemelhar-se com certas condições neoplásicas, necessitando de exames adicionais como de imagem e histopatológico (LEE, 2015). O diagnóstico da TBEP ainda permanece desafiador, pois as amostras clínicas são obtidas, na sua maioria, em ambiente hospitalar e apresenta-se na forma paucibacilar. Sempre que possível todo esforço deve ser realizado para o sucesso no diagnóstico, pois confirma a suspeita clínica, tendo em vista que a baciloscopia ou cultura não estará disponível para monitorar clinicamente a resposta ao tratamento (VADWAI *et al.*, 2011).

A tabela 2 mostra os resultados das culturas pelos três métodos estudados, onde analisando a taxa de contaminação, que consiste em observar a presença de microrganismos que produzam enzimas proteolíticas capazes de liquefazer o meio que contém ovos, alterando a cor e a consistência do meio, obteve-se uma maior taxa de contaminação no método LJ (11,5%), no OK (9,7%) e a menor foi o método MGIT (5,3%), abaixo do índice de avaliação de cultura recomendado (BRASIL, 2013).

Considerando todas as amostras semeadas, pode-se observar que o OK apresentou uma boa positividade (9,7%), quando comparado com o MGIT (7,1%), que é considerado padrão-ouro para esses materiais. O método MGIT possui limitações quanto aos materiais que podem ser semeados, daí a diferença na quantidade de semeaduras, pois 83 amostras de

sangue e medula óssea, o fabricante orienta que não pode semear no meio, pois ocorrerá interferência e o aparelho dará a mensagem de erro (BRASIL, 2013). Nesses casos, devem-se utilizar os meios de culturas sólidos OK e LJ. Houve situações em que as amostras não possuía o volume suficiente para a realização dos três métodos, tornando-se impossível realizar a semeadura.

Tabela 2 - Culturas realizadas para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras extrapulmonares, lavado broncoalveolar e secreção traqueal. Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil

| Resultado          | Métodos de Cultivo |                  |                  |
|--------------------|--------------------|------------------|------------------|
|                    | OK n (%)           | LJ n (%)         | MGIT n (%)       |
| <b>Positivo</b>    | 32 (9,7)           | 16 (5,1)         | 8 (7,1)          |
| <b>Negativo</b>    | 266 (80,6)         | 262 (83,4)       | 99 (87,6)        |
| <b>Contaminado</b> | 32 (9,7)           | 36 (11,5)        | 6 (5,3)          |
| <b>Total</b>       | <b>330 (100)</b>   | <b>314 (100)</b> | <b>113 (100)</b> |

Ressalta-se que são poucos os estudos que avaliaram o método OK comparando-o com o LJ, sendo esses realizados na Venezuela, Brasil, Gâmbia, Uruguai e Índia, todos eles em amostras de **escarro** e, em todos os estudos, ambos os métodos apresentaram um rendimento diagnóstico semelhante (KOTHADIA, SENGUPTA 1982; JASPE *et al.*, 2009; RIVAS *et al.*, 2010; PALACI *et al.*, 2013; JOBARTEH *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2018). Além disso, o meio de cultura OK é reconhecidamente barato e fácil de executar mesmo em locais com pouca estrutura laboratorial (FRANCO-SOTOMAYOR *et al.*, 2020; KOTHADIA, SENGUPTA, 1982).

Em um estudo com 685 amostras clínicas extrapulmonares, a positividade pelo OK foi 12,3% e pelo LJ 12,0%. Nenhuma diferença significativa para contaminação da cultura ou recuperação de colônias foi encontrada para os dois métodos. O tempo de resposta para o isolamento de *M. tuberculosis* foi significativamente menor no método OK, onde 77% das culturas apresentaram positividade dentro de três semanas após a incubação e apenas 6,1% de positividade para o método LJ no respectivo período (FRANCO-SOTOMAYOR *et al.*, 2020).

Realizou-se um estudo comparativo frente a outros três métodos, utilizando o OK como padrão de referência (padrão-ouro); em relação ao MGIT utilizou-se 88 amostras, 257 amostras ao LJ e 298 amostras ao LJ+MGIT (essa união de dois métodos foi realizada porque, independente do método, o paciente pode estar doente, com tuberculose). Avaliou-se sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP e VPN. Os resultados das análises estão

representados na tabela 3. O método de OK quando comparado ao MGIT resultou em maior sensibilidade, maior especificidade, maior acurácia, maior VPP e maior VPN. O método quando comparado à LJ+MGIT apresentou menor sensibilidade, menor especificidade, menor acurácia, menor VPP e menor VPN, em relação às outras duas comparações.

Tabela 3 - Precisão do método Ogawa-Kudoh (OK), em comparação com Löwenstein-Jensen (LJ), Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT) e associação LJ + MGIT. Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil

| <b>Método Índice/ Método Referência</b> | <b>Sensibilidade % (IC95%)</b> | <b>Especificidade % (IC95%)</b> | <b>Acurácia (%)</b> | <b>Valor Preditivo Positivo (VPP) % ( IC 95%)</b> | <b>Valor Preditivo Negativo (VPN) % ( IC 95%)</b> |
|---|--------------------------------|---------------------------------|---------------------|---|---|
| OK/MGIT (n=88)                          | 75,00<br>(30,1 a 95,4)         | 100,00<br>(95,6 a 100,0)        | 98,86               | 100,00<br>(43,85 a 99,99)                         | 98,82<br>(93,63 a 99,79)                          |
| OK/LJ (n=257)                           | 57,14<br>(32,6 a 78,6)         | 96,30<br>(93,1 a 98,0)          | 94,16               | 47,06<br>(29,16 a 69,03)                          | 97,50<br>(94,65 a 98,84)                          |
| OK/LJ + MGIT (n=298)                    | 56,25<br>(33,2 a 76,9)         | 91,84<br>(88,1 a 94,5)          | 89,93               | 28,13<br>(15,56 a 45,37)                          | 97,37<br>(94,66 a 98,71)                          |

IC95% = intervalo de confiança de 95%

Nas análises do desempenho do método OK, considerando como padrão de referência o MGIT, o LJ e a associação de ambos a acurácia foi aproximadamente 90%. Enquanto a especificidade e VPN foram elevadas, a sensibilidade do método OK foi relativamente baixa, principalmente quando o padrão de referência foi o LJ. Estes achados revelam que o método OK foi acurado e específico para o diagnóstico da tuberculose em materiais paucibacilares, portanto, adequado para a aplicação na rotina laboratorial.

O método MGIT é considerado referência para amostras paucibacilares, exceto sangue e medula óssea (BRASIL, 2013); é um método mais sensível e com menor tempo de crescimento comparado ao OK e LJ, a leitura dos tubos é realizada semanalmente, automaticamente (MOREIRA *et al.*, 2013). No comparativo, verificou-se que o método OK revelou maior acurácia (98,86%), quando comparado com o sofisticado método de MGIT.

Também foi analisada a concordância entre os métodos OK comparando ao LJ, OK comparando ao MGIT e LJ comparando ao MGIT, verificando que a concordância entre o método OK e o método MGIT, foi quase perfeita com índice Kappa de 0,851 (IC 95% 0,851),

conforme demonstrado na tabela 4. Já a tabela 5 mostra que a positividade do OK não diferiu dos outros métodos.

Tabela 4 - Grau de concordância entre os métodos Ogawa – Kudoh (OK), Löwenstein – Jensen (LJ) e Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT) em amostras pulmonares e extrapulmonares no Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil

| Pares (A vs B)    | Total | A+/B+ | A-/A- | A+/B- | A-/B+ | Kappa | IC 95%      | Força          |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|----------------|
| <b>OK vs LJ</b>   | 257   | 8     | 234   | 9     | 6     | 0,485 | 0,233-0,738 | Moderada       |
| <b>OK vs MGIT</b> | 88    | 3     | 84    | -     | 1     | 0,851 | 0,562-1,000 | Quase Perfeita |
| <b>LJ vs MGIT</b> | 89    | 2     | 85    | 1     | 1     | 0,655 | 0,182-1,000 | Substancial    |

O coeficiente de kappa foi interpretado da seguinte forma: (a) ruim: quando abaixo de 0,00; (b) leve: entre 0,00 e 0,20; (c) razoável: entre 0,21 e 0,40; (d) moderado: entre 0,41 e 0,60; (e) substancial: entre 0,61 e 0,80; e (d) quase perfeito: entre 0,81 e 1,00.

Tabela 5 - Positividade das culturas de *Mycobacterium tuberculosis*, por tipo de amostra e método no Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil

| Tipo de material                  | MGIT<br>% (n/total)    | LJ<br>% (n/total)       | OK<br>% (n/total)        | p     |
|-----------------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------|
| <b>Material extrapulmonar</b>     |                        |                         |                          |       |
| Líquido céfalo-espinhal           | 0,0 (0/52)             | 3,6 (3/83)              | 4,8 (4/84)               | 0,297 |
| Swab de material não especificado | -                      | -                       | 100,0 (1/1)              | -     |
| Medula óssea                      | 0,0 (0/8)              | 0,0 (0/62)              | 0,0 (0/69)               | -     |
| Biópsia                           | 0,0 (0/4)              | 17,2 (5/29)             | 11,1 (3/27)              | 0,573 |
| Fragmentos de tecidos diversos    | -                      | 7,7 (1/13)              | 14,3 (2/14)              | 0,946 |
| Líquido pleural                   | 0,0 (0/7)              | 0,0 (0/17)              | 5,6 (1/18)               | 0,505 |
| Urina                             | 12,5 (1/8)             | 6,7 (1/15)              | 8,3 (1/12)               | 0,892 |
| Sangue                            | -                      | 0,0 (0/12)              | 0,0 (0/12)               | -     |
| Linfonodos                        | 33,3 (1/3)             | 33,3 (1/3)              | 50,0 (2/4)               | 0,503 |
| Lavado gástrico                   |                        | 0,0 (0/2)               | 0,0 (0/2)                | -     |
| Líquido ascítico                  | 0,0 (0/2)              | 0,0 (0/3)               | 0,0 (0/3)                | -     |
| <b>Material pulmonar</b>          |                        |                         |                          |       |
| Secreção traqueal                 | 42,9 (6/14)            | 22,7 (5/22)             | 34,5 (10/29)             | 0,503 |
| Lavado bronco-alveolar            | 0,0 (0/8) <sup>a</sup> | 0,0 (0/16) <sup>a</sup> | 36,4 (8/22) <sup>a</sup> | 0,005 |

Valor de p no teste do qui-quadrado. Letras iguais na linha indicam que não há diferença entre os métodos (teste do qui-quadrado, com correção de Bonferroni).

O método OK vem sendo utilizado rotineiramente pelo LACEN/MS para escarro, como uma excelente opção, barata, rápida e simples para a confirmação bacteriológica do *M. tuberculosis*, estando descentralizada em 17 laboratórios de 10 municípios, representando em 2018 cerca de 60% da população sul-mato-grossense se beneficiando do diagnóstico da tuberculose por este método (CUNHA, MARQUES, GONÇALVES, 2018), no entanto, o seu uso para cultura de materiais paucibacilares era uma opção na falta dos meios de LJ.

A despeito de evidências de confirmação de *Mycobacterium tuberculosis* em alguns semeados, nenhum estudo comparando os três métodos para materiais paucibacilares foi publicado até o momento, fazendo este estudo ser pioneiro, por comparar o desempenho do OK com LJ e MGIT. Outros benefícios importantes do método OK é o fato de não necessitar de equipamentos de laboratório e, devido à mínima manipulação da amostra, apresenta baixo risco de contaminação, por liberar uma quantidade mínima de aerossol durante a manipulação da amostra (FRANCO-SOTOMAYOR, 2020).

Segundo Franco-Sotomayor *et al.* (2020) a maioria dos países e a OMS limita a recomendação em manuais de laboratório para o uso do método LJ, mais complexo tecnicamente. Somente a Organização Pan-Americana da Saúde, menciona o método OK em seu manual para o diagnóstico bacteriológico da tuberculose, mas apenas em relação ao processamento de amostras de escarro e para laboratórios que não disponham de equipamento suficiente para a realização do método LJ (OPS, 2008).

Outras vantagens do método OK dizem respeito ao menor tempo de crescimento quando comparado ao método LJ, demonstrado que método OK, além do menor tempo no processamento, acelera o diagnóstico por 2 a 3 semanas, bem como permite recuperar o mesmo número de colônias necessárias para outras avaliações, como teste de sensibilidade aos fármacos e/ou caracterização genética da espécie (FRANCO-SOTOMAYOR, 2020).

A simplicidade do método OK permite o cultivo rápido e seguro de amostras em locais de campo, ao ar livre e sem a presença de uma estrutura de laboratório, tornando-o especialmente adequado para áreas rurais, países com grandes populações, onde a incidência da tuberculose é elevada e a doença é negligenciada, sem investimento no diagnóstico (FRANCO-SOTOMAYOR *et al.*, 2019; ROMERO-SANDOVAL, *et al.*, 2007; MAES *et al.*, 2008).

No mundo, a tuberculose é uma das 10 principais causas de morte e a principal causa por um único agente infeccioso, estando acima de HIV/Aids. Em 2018, verificou-se que 10 milhões de pessoas desenvolveram a TB (5,8 milhões de homens, 3,2 milhões de mulheres e 1,0 milhão de crianças), na sua grande maioria adulta (90%) e 9% eram pessoas vivendo com

HIV. A TB causou cerca de 1,3 milhões de mortes em pessoas HIV-negativas e havendo um acréscimo em 300.000 mortes entre pessoas HIV-positivas (WHO, 2019).

No caso de tuberculose extrapulmonar, vários fatores podem complicar o diagnóstico da doença, seja em razão da natureza paucibacilar, pela variabilidade nos resultados positivos encontrado em cultura que oscilam de 12% a 80%, além da variedade de amostras clínicas/tecidos biológicos, o que implica uma distribuição não uniforme do bacilo, bem como a presença de sinais e sintomas não específicos (BARANI *et al.*, 2012; SEKAR *et al.*, 2008; NEGI *et al.*, 2007; PUROHIT *et al.*, 2012).

A comparação entre OK e LJ em amostras pulmonares e extrapulmonares realizada no México (FRANCO-SOTOMAIOR *et al.*, 2020) revelou não haver diferença significativa na capacidade de diagnóstico da tuberculose entre os dois métodos. Em nosso estudo, observou-se que o método OK apresentou uma capacidade de diagnosticar os verdadeiramente doentes em 75% dos casos quando comparado ao MGIT e, 57,14% em relação ao LJ e 56,25% em relação ao LJ+MGIT, mostrando que possui uma boa capacidade de diagnosticar corretamente os doentes, sendo uma boa alternativa de cultivo, semelhante aos métodos de cultivo comumente utilizados para esses materiais.

A capacidade do método OK, nesta situação de comparar a um método padrão (MGIT, LJ e LJ+MGIT) apresentou uma capacidade de diagnosticar corretamente os indivíduos sadios (100%, 96,30% e 91,84%), demonstrando que o mesmo possui uma excelente capacidade de detectar as verdadeiras amostras negativas.

No estudo retrospectivo de avaliação do desempenho da cultura líquida MGIT para amostras pulmonares, em condição de rotina, após dois anos de implantação em uma rede de laboratórios públicos regionais do Instituto Adolfo Lutz, verificou-se uma acurácia de 91,3% (PEDRO *et al.*, 2017). No presente estudo, a acurácia do OK quando comparado ao MGIT foi de 98,86%, ou seja, excelente capacidade de encontrar os verdadeiros doentes.

Diante da inexistência de trabalhos avaliando o método OK para amostras paucibacilares, podemos demonstrar através do índice kappa que os resultados encontrados, quando comparado com os métodos LJ e MGIT, o método OK apresentou uma boa concordância, sendo moderada e quase perfeita, respectivamente, configurando assim uma alternativa no cultivo desses materiais, capaz de determinar a doença com a mesma precisão que o recomendado LJ.

Para verificar se determinado tipo de material apresentava uma tendência melhor de crescimento pelo método OK, quando comparado com os outros dois métodos, o que se

verificou foi que, independentemente da amostra biológica avaliada, a proporção de casos positivos e negativos, não diferiu entre os métodos.

As principais limitações do estudo dizem respeito à ausência de um exame padrão-ouro para o diagnóstico das formas paucibacilares. Sabe-se que a sensibilidade dos métodos moleculares no diagnóstico de TB pulmonar e de TBEP, como os da plataforma Genexpert, são mais elevadas que as culturas (VADWAI *et al.*, 2011; LEE, 2015), no entanto, não foi possível sua execução no presente estudo. Outra limitação foi a ausência de amostras de indivíduos saudáveis, para servir como controle negativo.

Temos que considerar que o estudo foi realizado sem qualquer interferência dos pesquisadores na execução das culturas, seguindo a rotina do LACEN, portanto sujeitos a não adesão às recomendações protocolares da semeadura e, mesmo assim, obteve-se êxito em demonstrar a alta performance do método OK.

## 6 CONCLUSÃO

Com o objetivo de melhorar o diagnóstico das amostras paucibacilares, confirmar a suspeita clínica e agilizar a identificação e o tratamento dos casos, realizou-se a cultura pelo método OK, pois o mesmo já se encontra implantado em 60% do Estado.

A positividade das culturas de micobactéria em amostras paucibacilares, pelo OK, LJ e MGIT, foi respectivamente de 32 (9,7%), 16 (5,1%) e 8 (7,1%), demonstrando que o método OK apresentou uma boa positividade, superior até que o método padrão-ouro (MGIT) para esses tipos de materiais.

A relação do método OK diante dos métodos MGIT, LJ e a associação de ambos, atribuindo a esses como padrão-ouro, as análises pode-se concluir que a acurácia foi respectivamente de 98,86%, 94,16% e 89,93%. A sensibilidade diante do MGIT foi de 75,00%, do LJ de 57,14% e de LJ+MGIT foi de 56,25%. A especificidade foi de 100,00%, 96,30% e 91,84%, respectivamente.

A capacidade de encontrar os doentes entre os positivos (VPP) foi no MGIT de 100,00%, no LJ de 47,06% e na associação de LJ+MGIT de 28,13%. Já a capacidade de encontrar os sadios (sem a doença) ao teste foi de 98,82%, 97,50% e 97,37%, respectivamente. Estes achados revelam que o método OK foi acurado e específico para o diagnóstico da tuberculose em materiais paucibacilares, portanto, adequado para a aplicação na rotina laboratorial.

O resultado das concordâncias entre os métodos, sendo OK comparando ao LJ (0,485), OK comparando ao MGIT (0,851) e LJ comparando ao MGIT (0,655), verificou-se que a concordância entre o método OK e o método MGIT, foi quase perfeita com índice Kappa de 0,851 (IC 95% 0,851).

O método OK se mostrou preciso e específico para o diagnóstico de tuberculose em amostras paucibacilares de apresentações pulmonares e extrapulmonares suspeitas, capaz de confirmar a doença com a mesma precisão dos métodos LJ e MGIT - características que o tornam adequado para uso na prática laboratorial de rotina em nível local e regional, particularmente onde os recursos são escassos.

## REFERÊNCIAS

- ALAVI, S.M.; BAKHTIYARINIYA, P.; ALBAGI, A. Factors associated with delay in diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis. **Jundishapur J Microbiol.**, v. 8, n. 3, 2015.
- BARANI, R. *et al.* Improved detection of Mycobacterium tuberculosis using two independent PCR targets in a tertiary care centre in South India. **J Infect Dev Ctries.**, v. 6, n. 1, p. 46-52, 2012.
- BOFFO, M. M. S. *et al.* Tuberculose extrapulmonar em pacientes com AIDS na cidade do Rio Grande, Brasil: diagnóstico laboratorial. **Rev Port Pneumol.**, n. 6, p. 277-282, 2000.
- BRAGA, J. U *et al.* Comportamento epidemiológico da tuberculose no Brasil na década de 80: estudo de morbidade. **J Bras Pneumol.**, p:18-119, 1992.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo7: **Deteccção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica.** Brasília: Anvisa, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. **Manual TELELAB.** Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia. Brasília. 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias.** Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil.** Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Brasil Livre da Tuberculose: Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública.** Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil.** Brasília: Ministério da Saúde, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Boletim epidemiológico.** Brasília: Ministério da Saúde, número especial, março de 2020.
- CAPONE, D. *et al.* Tuberculose extrapulmonar. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 5, n. 2, p. 54-67, 2006.

CHENG, V.C., YEW, W.W., YUEN, K.Y. Molecular diagnostics in tuberculosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 24, n. 11, p. 711-720, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-005-0039-1>. Acesso em: 20 abr. 2019.

COSTA, R. R. *et al.* Comparison between Kudoh-Ogawa and modified Petroff techniques for mycobacteria cultivation in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Einstein** (São Paulo), v. 16, n. 2, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1679-45082018AO4214>. Acesso em: 3 abr. 2020.

CUNHA E. A. *et al.* Incidence and transmission patterns of tuberculosis among indigenous populations in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 1, p. 108-113, fev., 2014.

CUNHA, E. A. T. *et al.* A diagnosis of pulmonary tuberculosis and drug resistance among inmates in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 51, n. 3, p. 324-30, 2018.

CUNHA, E. A. T., MARQUES, M., GONÇALVES, T. O. Benefícios advindos da técnica de Ogawa-Kudoh para diagnóstico, controle e avaliação da tuberculose em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Saúde Pública de Mato Grosso do Sul**, v. 1, n. 1, p. 102-109, 2018.

DANIEL, T. M. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? **Int J Tuberc Lung Dis**, n. 4, p. 395-400, 2000.

DENKINGER, C.M. *et al.* Defining the needs for next generation assays for tuberculosis. **J Infect Dis.**, 1; 211, Apr., 2015. Suppl 2(Suppl 2):S29-38. doi: 10.1093/infdis/jiu821. PMID: 25765104; PMCID: PMC4447829.

FANLO, P., TIBERIO, G. Tuberculosis extrapulmonar/ Extrapulmonary tuberculosis. **An Sist Sanit Navar.**, n. 30, p. 143-162, 2007 (Supl. 2).

FRANCO-SOTOMAYOR, G. *et al.* A first insight into the katG and rpoB gene mutations of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains from Ecuador. **Microb Drug Resist.**, n. 25, p. 524-527, 2019.

FRANCO-SOTOMAYOR, G. *et al.* Fast, simple, and cheap: the Kudoh-Ogawa swab method as an alternative to the Petroff–Lowenstein-Jensen method for culturing of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1-6, Apr., 2020.

GIAMPAGLIA, C. M. S. *et al.* Multi-center Evaluation of Automated Bactec MGIT 960 System for testing susceptibility of M. tuberculosis as compared with BACTEC 460TB, Proportion and Resistance Ratio Methods in Southeast of Brazil. **Int J Tuberc Lung Dis.**, v. 1, n. 9, p. 986-991, 2007

GOMES, T. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in Brazil: a hierarchical model. **BMC Infect Dis.**, v. 14, n. 9, p. 1-9, 2014.

GOMES, T. **Tuberculose extrapulmonar**: uma abordagem epidemiológica e molecular. 2013. 117 f. Orientadora: Ethel Leonor Noia Maciel. Dissertação (Mestrado em Doenças Infeciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde. Espírito Santo, 2013.

GRINER, P. F. *et al.* Selection and interpretation of diagnosis tests and procedures. **Ann Intern Med.**, n. 94, p. 553-600, 1981.

HILLEMANN, D. *et al.* Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. **J. Clin. Microbiol.**, n. 49, p. 1202-1205, 2011.

JASPE, R. C. *et al.* Evaluation of the Kudoh swab method for the culturing of *Mycobacterium tuberculosis* in rural areas. **Trop Med Int Health**, n. 14, p. 468-471, 2009.

JOBARTEH, T. *et al.* Evaluation of the Kudoh method for mycobacterial culture: Gambia experience. **Int J Mycobacteriol.**, n. 5, 2016. Suppl 1:S166.

KOTHADIA, S. N.; SENGUPTA, S. R. Evaluation of swab culture method of Kudoh and Kudoh for cultivation of *M. tuberculosis*. **Indian J Med Sci.**, n. 36, p. 9-11, 1982.

KUDOH, S., KUDOH, T. A simple technique to culturing tubercle bacilli. **Bull. World Health Organ**, n. 51, p. 71-82, 1974.

LANDIS, J. R., KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n.1, p. 159-174, 1977.

LAWN, S. D., ZUMLA, A. I. Tuberculosis. **Lancet.**, v. 2, n. 378 (9785), p. 57-72, julho, 2011. Disponível em: doi: 10.1016/S0140-6736(10)62173-3. Acesso em: 20 mar. 2019.

LEE, J. Y. Diagnosis and Treatment of Extrapulmonary Tuberculosis. **Tuberc Respir Dis.**, v. 78, n. 2, p. 47-55, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4046/trd.2015.78.2.47>. Acesso em 12 mar. 2019.

LOPES, A. J. *et al.* Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. **Pulmão RJ.** v. 15, n. 4, p.253-261, 2006.

MACIEL, M. S. *et al.* A história da tuberculose no Brasil: os muitos tons (de cinza) da miséria. **Revi Socied Bras Clín Méd.**, v. 10, n. 3, p.:226-230, 2012.

MAES, M. *et al.* 24-Locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. **Tuberculosis (Edinb)**, n. 88, p. 490-494, 2008.

MOREIRA, A. S. R. *et al.* Performance comparison between the mycobacteria growth indicator tube system and Löwenstein-Jensen medium in the routine detection of *Mycobacterium tuberculosis* at public health care facilities in Rio de Janeiro, Brazil: preliminary results of a pragmatic clinical trial. **J Bras Pneumol.**, n. 39, p.365-367, 2013.

NEGI, S. S. *et al.* Diagnostic potential of IS6110, 38kDa, 65kDa and 85B sequence-based polymerase chain reaction in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. **Indian J Med Microbiol.**, v. 25, n. 1, p. 43-49, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4103/0255-0857.31061> PMID:17377352. Acesso em: 13 mar. 2019.

OPS. Organización Panamericana de Salud, 2008. **Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis** – normas y guía técnica - Parte II. Cultivo, 2008. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/18616>. Acesso em: 12 abr. 2019.

PALACI, M. *et al.* Contribution of the Ogawa-Kudoh swab culture method to the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Brazil. **Int J Tuberc Lung Dis.**, n. 17, p.782-786., 2013.

PARSONS, L.M. *et al.* Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. **Clin Microbiol Rev.**, v. 24, n. 2, p. 314-50, 2011.

PEDRO, H. S. *et al.* Avaliação do desempenho dos meios de cultura Ogawa-Kudoh e MGITTM para isolamento de micobactérias. **BEPA**, v. 8, n. 91, p. 5-13, 2011.

PEDRO, H. S. P. *et al.* Desempenho da cultura líquida MGIT após implementação em uma rede de laboratórios públicos do estado de São Paulo. **Rev Inst Adolfo Lutz**, São Paulo, 76:e1727, 2017.

PROCOP, G.W. Laboratory Diagnosis and Susceptibility Testing for Mycobacterium tuberculosis. **Microbiol Spectr.**, v. 4, n. 6, 2016.

PUROHIT, M. R. *et al.* Rapid diagnosis of tuberculosis in aspirate, effusions, and cerebrospinal fluid by immunocytochemical detection of Mycobacterium tuberculosis complex specific antigen MPT64. **Diagn Cytopathol.**, v. 40, n. 9, p. 782-791, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/dc.21637>. Acesso em: 20 abr. 2019.

RAMIREZ-LAPAUSA, M.; MENENDEZ-SALDANA, A. Â; NOGUERADO-ASENSIO, A. Tuberculosis extrapulmonar, una revision. **Rev. esp. sanid. penit.**, v. 17, n. 1, p. 3-11. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4321/S1575-06202015000100002>. Acesso em: 12 abr. 2019.

RIOS, M. Z. **Sanatório Getúlio Vargas: medicina e relações sociais no combate da tuberculose no Espírito Santo (1942-1967)**. 2009. 148 f. Orientador: Sebastião Pimentel Franco. Dissertação (Mestrado em História). Centro de Ciências Humanas e Naturais. Universidade do Estado do Espírito Santo, UFES, 2009.

RIVAS, C. *et al.* Performance of the Kudoh-Ogawa method for isolation of mycobacteria in a laboratory with large-scale workload. **Rev. Argent. Microbiol.**, n. 42, p. 87-90, 2010.

RODRÍGUEZ, D. P. *et al.* Comparación de los medios Ogawa y Löwenstein Jensen en el aislamiento de Mycobacterium tuberculosis de pacientes con tuberculosis pulmonar. Hospital Regional Docente de Trujillo, Perú. **Rev Méd Vallejana**, v. 4, n. 1, p. 24-31, 2007.

ROMERO-SANDOVAL, N. C. *et al.* Pulmonary tuberculosis in an indigenous community in the mountains of Ecuador. **Int J Tuberc Lung Dis.**, n. 11, p. 550-555, 2007.

ROSEMBERG, J. **Tuberculose: Panorama Global, Óbices para o seu Controle.** Fortaleza, Secretaria de Estado da Saúde, Coordenação do Adulto – Tuberculose, 1999.

RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 1, p. 51-58, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822002000100010>. Acesso em: 15 jun. 2019.

SEKAR, B. *et al.* The utility of IS6110 sequence based polymerase chain reaction in comparison to conventional methods in the diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis. **Indian J Med Microbiol.**, v. 26, n. 4, p. 352-355, 2008.

SULIS, G. *et al.* Recent developments in the diagnosis and management of tuberculosis. **NPJ Prim Care Respir Med.**, n. 26, 2016.

TAKAO, E. K. H. *et al.* Comparação de métodos de cultivo para o diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar. **Acta Sci. Health Sci.**, v.27, n.2, p.183-188, 2005.

VADWAI, V. *et al.* Xpert MTB/RIF: a new pillar in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis? **J Clin Microbiol.**, v. 49, p. 2540-2545, 2011.

VITAL JÚNIOR, A.C. Avaliação do perfil epidemiológico da tuberculose e a sua coinfeção TB-HIV nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 1, p.441-456, jan., 2020.

WHO. World Health Organization. **Global tuberculosis report.** France: WHO, 2017.

WHO. World Health Organization. **Global Tuberculosis Report 2018.** Geneva: WHO, 2018.

WHO. World Health Organization. **Global Tuberculosis Report 2019.** Geneva: WHO, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-report-2019>. Acesso em: 15 mar. 2019.

WHO. World Health Organization. **Global Tuberculosis Report 2020.** Geneva: WHO, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>. Acesso em: 15 maio, 2021.

**APÊNDICE**  
**ARTIGO PUBLICADO NO *BRAZILIAN JOURNAL OF DEVELOPMENT***  
**<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/32139>**

## **Desempenho do método Ogawa-Kudoh em cultura de *Mycobacterium tuberculosis* de amostras paucibacilares**

### **Ogawa–Kudoh method performance in *Mycobacterium tuberculosis* culture of paucibacillary samples**

DOI:10.34117/bjdv7n6-713

Recebimento dos originais: 30/05/2021

Aceitação para publicação: 30/06/2021

#### **Paulo Ricardo de Souza Moraes**

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Campo Grande, MS, Brasil  
Cidade Universitária s/n, Unidade 9 - Campo Grande - MSE-mail: [moraespr@terra.com.br](mailto:moraespr@terra.com.br)

#### **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marli Marques**

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Instituto Integrado de Saúde. Programade Pós-Graduação em Saúde da Família. Campo Grande, MS, Brasil  
Cidade Universitária s/n, Unidade 9 - Campo Grande - MSE-mail: [marli.marques2008@gmail.com](mailto:marli.marques2008@gmail.com)

#### **Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza**

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Instituto de Biociências. Campo Grande, MS, Brasil  
R. Ufms, S/n - Cidade Universitária, Campo Grande - MSE-mail: [albertss@hotmail.com](mailto:albertss@hotmail.com)

#### **Dr<sup>a</sup>. Eunice Atsuko Totumi Cunha**

Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso de Sul. Laboratório Central de Saúde Pública. Seção de Micobacteriologia. Campo Grande, MS, Brasil.  
Av. Felinto Müller, 1666 - Campo Grande – MSE-mail: [euniceatsuko@uol.com.br](mailto:euniceatsuko@uol.com.br)

#### **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anamaria Mello Miranda Paniago**

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Campo Grande, MS, Brasil  
Cidade Universitária s/n, Unidade 9 - Campo Grande - MSE-mail: [anapaniago@yahoo.com.br](mailto:anapaniago@yahoo.com.br)

### **RESUMO**

**OBJETIVO:** Avaliar o desempenho do método Ogawa – Kudoh (OK) para o diagnóstico de tuberculose em materiais de amostra paucibacilar pulmonar e extrapulmonar, em relação ao processamento de Lowenstein-Jensen (LJ) e Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT). **MÉTODOS:** Este estudo transversal utilizou amostras extrapulmonares e pulmonares (exceto escarro) recebidas no Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul entre fevereiro de 2017 e março de 2018. As amostras foram submetidas ao processamento de OK, LJ e MGIT de acordo com o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial de Tuberculose e Outras Micobactérias 2008. **RESULTADOS:** Um total de 347 amostras (83,3% extrapulmonar, 16,7% pulmonar) foram semeadas em pelo menos um dos três meios (OK: 330; LJ: 314; MGIT: 113). A maioria das amostras extrapulmonares consistia de líquido cefalorraquidiano (28,2%), medula óssea (20,5%) e fragmentos de tecido (16,7%). As amostras pulmonares foram predominantemente lavado brônquico alveolar (6,9%) e

secreção traqueal (9,8%). Adotando o MGIT como referência, o OK provou ser 75% sensível e 100% específico. Com LJ como referência, a sensibilidade de OK foi de 57,1% e a especificidade de 96,3%. As categorias de concordância foram as seguintes: OK vs. LJ, moderada ( $\kappa = 0,485$ ); OK vs. MGIT, quase perfeito ( $\kappa = 0,851$ ); LJ vs. MGIT, substancial ( $\kappa = 0,655$ ). O método OK se mostrou preciso e específico para o diagnóstico de tuberculose em materiais de amostra paucibacilar pulmonar e extrapulmonar, fornecendo a mesma precisão que LJ e MGIT, caracterizando a abordagem como uma ferramenta laboratorial valiosa para investigar casos de suspeita de tuberculose em instalações laboratoriais com recursos limitados.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculose, Diagnóstico, Meios de Cultivo

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** To assess the performance of the Ogawa–Kudoh (OK) method for tuberculosis diagnosis in pulmonary and extrapulmonary paucibacillary sample materials, relative to Lowenstein-Jensen (LJ) and Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) processing. **METHODS:** This cross-sectional study employed extrapulmonary and pulmonary samples (other than sputum) received at the Mato Grosso do Sul Central Public Health Laboratory between February 2017 and March 2018. The samples were subjected to OK, LJ, and MGIT processing as per the 2008 National Manual for Laboratory Surveillance of Tuberculosis and Other Mycobacteria. **RESULTS:** A total of 347 samples (83.3% extrapulmonary, 16.7% pulmonary) were seeded in at least one of three media (OK: 330; LJ: 314; MGIT: 113). Most extrapulmonary samples consisted of cerebrospinal fluid (28.2%), bone marrow (20.5%), and tissue fragments (16.7%). Pulmonary samples were predominantly alveolar bronchial lavage (6.9%) and tracheal secretion (9.8%). Adopting MGIT as a reference, OK proved 75% sensitive and 100% specific. With LJ as the reference, OK sensitivity was 57.1% and specificity 96.3%. Agreement categories were as follows: OK vs. LJ, moderate ( $\kappa = 0.485$ ); OK vs. MGIT, almost perfect ( $\kappa = 0.851$ ); LJ vs. MGIT, substantial ( $\kappa = 0.655$ ). The OK method proved accurate and specific for diagnosing tuberculosis in pulmonary and extrapulmonary paucibacillary sample materials, providing the same accuracy as LJ and MGIT, characterizing the approach as a valuable laboratory tool for investigating cases of suspected tuberculosis in laboratory facilities with limited resources.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis, Diagnosis, Culture media

## 1 INTRODUÇÃO

Com 10 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo (estimativas de 2020), a tuberculose está entre as dez principais causas de morte, sendo responsável por 1,2 milhões de mortes, das quais 208.000 envolvem pacientes infectados pelo HIV. Um total de 30 países, incluindo o Brasil, respondem por 84,2% dos casos atuais.<sup>1</sup>

Globalmente, o acesso limitado aos serviços de saúde e a falta de disponibilidade de métodos diagnósticos foram identificados como fatores importantes que contribuem para a subnotificação. Garantir o acesso à saúde para cerca de três milhões de casos “perdidos” representa uma das cinco principais prioridades no esforço para eliminar a tuberculose.<sup>2</sup>

A suspeita de caso é baseada em pelo menos um dos quatro sintomas sugestivos: febre de longa duração, tosse por duas semanas ou mais, suores noturnos e perda de peso. Alterações radiológicas, bem como dados epidemiológicos, como histórico de contato com tuberculose pulmonar ou exposição a outros fatores de risco para aquisição de doença ou reativação endógena também devem ser considerados.<sup>3</sup>

O diagnóstico definitivo, no entanto, só pode ser alcançado pela detecção do agente etiológico em amostras respiratórias ou outros locais (pleural, linfático / ganglionar, osteoarticular, geniturinário, intestinal, peritoneal, pericárdico, ocular, cutâneo ou do sistema nervoso central - a lista não exaustiva) .<sup>4,5,6</sup> Atenção especial deve ser dada aos pacientes infectados pelo HIV e portadores de doenças crônicas que podem mascarar os sintomas, retardando a identificação de casos suspeitos de tuberculose.<sup>4</sup>

O teste de BAAR pode confirmar 50-60% dos casos pulmonares, mas a cultura é necessária para amostras extrapulmonares, geralmente paucibacilares e esfregaço negativo,<sup>6</sup> para os quais a taxa de detecção de BAAR mal excede 25% dos casos.<sup>7</sup>

Embora métodos de diagnóstico mais rápidos e sensíveis tenham se tornado recentemente disponíveis (por exemplo, GeneXpert MTB / RIF, um teste de amplificação de ácido nucleico<sup>4</sup>), seu uso no Brasil tem sido dificultado por limitações de recursos financeiros, humanos e de infraestrutura.<sup>8</sup>

Apesar das recomendações para testes de cultura universais em casos de suspeita de tuberculose,<sup>5</sup> nem todas as regiões possuem laboratórios suficientemente equipados e com pessoal para realizar culturas ou testes moleculares rápidos, especialmente em amostras extrapulmonares ou espécimes coletados durante procedimentos hospitalares<sup>7</sup>.

A cultura, considerada o método padrão ouro por sua alta especificidade e sensibilidade, é crucial como exame complementar,<sup>3</sup> detectando 30% de casos adicionais não confirmados por testes de esfregaço anteriores. No entanto, o uso de cultura em grande escala é limitado pelo crescimento lento de micobactérias (2-6 semanas em meio líquido) e pela necessidade de infraestrutura de laboratório de biossegurança de nível 3 e recursos humanos altamente qualificados, entre outros fatores.<sup>9</sup> Isolados obtidos de culturas também podem servir para outros fins, incluindo teste de sensibilidade a drogas, análise de biologia molecular e sequenciamento genético.<sup>7</sup>

Para culturas de micobactérias, o Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS) usa rotineiramente meio líquido Middlebrook 7H9 (sistema de detecção Bactec MGIT960) para amostras pulmonares e extrapulmonares, e meios de cultura

sólidos à base de ovo - a saber, Löwenstein- Jensen (LJ) para amostras pulmonares e extrapulmonares e meio Ogawa-Kudoh (OK) para amostras pulmonares.

Em contraste com essas abordagens padrão, a presente investigação concentrou-se na aplicação do método OK a amostras paucibacilares (líquido de lavagem broncoalveolar, líquido cefalorraquidiano e de outros locais) semeadas no LACEN-MS usando a abordagem OK, com crescimento micobacteriano bem-sucedido, como em uma investigação recente.

O objetivo deste estudo foi investigar o desempenho do método OK no diagnóstico da tuberculose com base em amostras paucibacilares pulmonares e extrapulmonares, em comparação com o processamento LJ e a abordagem do Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT).

## 2 MÉTODOS

Este estudo transversal investigou amostras pulmonares e extrapulmonares (exceto escarro) recebidas no Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS) entre fevereiro de 2017 e março de 2018 para teste de BAAR. O laboratório recebe amostras clínicas de todos os serviços de saúde do Estado de Mato Grosso do Sul (Centro-Oeste do Brasil) para confirmação por cultura de tuberculose e testes de sensibilidade a medicamentos. As amostras incluídas no estudo foram provenientes de pacientes com suspeita clínica atendidos em serviços de referência para doenças infecciosas e hospitais do Estado.

Das 8.201 amostras recebidas no período de estudo, 7.829 foram de escarro e 372 pulmão ou amostras extrapulmonares coletadas por meio de procedimentos hospitalares. Das 372 amostras iniciais, 25 foram posteriormente excluídas por estarem abaixo do padrão, não serem identificadas ou por apresentarem volume insuficiente para semeadura em pelo menos um dos três métodos investigados. Um total de 347 amostras foram investigadas: 58 amostras pulmonares (lavagem broncoalveolar ou secreção traqueal) e 289 amostras extrapulmonares.

Amostras de locais não estéreis (por exemplo, urina, secreções, lavagem brônquica) foram descontaminadas e centrifugadas e / ou maceradas antes da semeadura. Amostras estéreis (por exemplo, líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, fragmentos de órgãos, sangue, medula óssea) não requerem descontaminação. Todas as amostras foram manuseadas em cabine de segurança biológica e selecionadas para semeadura para cada um dos três métodos.

## 2.1 MÉTODO MGIT: DESCONTAMINAÇÃO, SEMEADURA EM MEIO LÍQUIDO E DETECÇÃO DE BAAR

As amostras foram descontaminadas pelo método de Petroff<sup>11</sup> modificado, da seguinte forma: um volume de 2 mL de amostra foi transferido para um tubo Falcon, para o qual o mesmo volume de solução de NaOH 4% contendo vermelho de fenol (40 g de NaOH, 0,4 g de vermelho de fenol, 1000 mL de água destilada estéril). A mistura foi homogeneizada, mantida a  $36 \pm 1$  °C por 15 min para fluidificação-descontaminação e centrifugada a 3000 x g por 15 min. HCl 1N foi então adicionado ao tubo gota a gota até a cor da mistura mudar para amarelo. Finalmente, uma solução neutralizante (4 g de NaOH, 0,004 g de vermelho de fenol, 0,2 g de sulfato de potássio de alumínio, 1000 mL de água destilada estéril) foi adicionada até a mistura ficar rosa (pH 6,8-7,2). Para cada material assim preparado, uma gota foi desenhada e montada em uma lâmina para teste de BAAR usando coloração de Ziehl-Neelsen (ZN). Os materiais de amostra também foram semeados em tubos contendo meio líquido Middlebrook 7H9, específico para testes MGIT - um método que emprega um sensor fluorescente (rutênio pentahidratado em base de silicone) para detectar oxigênio liberado por micobactérias. Os tubos foram incubados a 37 °C em um sistema BD Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) e monitorados automaticamente para resultados positivos ou negativos.

## 2.2 MÉTODO LJ: DESCONTAMINAÇÃO, SEMEADURA EM MEIO SÓLIDO E DETECÇÃO DE BAAR

As amostras foram descontaminadas usando um método de Petroff modificado,<sup>11</sup> processadas para preparação de lâminas conforme descrito para a abordagem MGIT e semeadas em meio LJ. Os tubos semeados foram incubados a  $36 \pm 1$  °C e manuseados manualmente semanalmente para inspeção.<sup>7</sup>

## 2.3 MÉTODO OK: DESCONTAMINAÇÃO, SEMEADURA EM MEIO SÓLIDO E DETECÇÃO DE BAAR

Amostras não processadas foram esfregadas em lâminas de vidro para investigação de BAAR usando coloração ZN. O material de amostra restante foi então descontaminado por imersão em NaOH 4% por 2 min. O excesso de NaOH foi removido pressionando o swab contra a parede do frasco, seguido de semeadura em meio OK (pH 6,4, ligeiramente ácido).

Os tubos semeados foram incubados a  $36 \pm 1$  °C e manuseados manualmente, semanalmente, para inspeção.<sup>7</sup>

O crescimento da cultura foi avaliado quanto à morfologia da colônia (aparência e cor). Uma porção da área de crescimento foi usada para preparar uma lâmina corada com ZN e examinada para BAAR e fator de cordão.<sup>7</sup> Os materiais de amostra também foram submetidos a testes imunocromatográficos para detecção da proteína MPT64, que ocorre em *Mycobacterium tuberculosis* (SD Bioline Kit, Standard Diagnostics, Korea), mas não em micobactérias não tuberculosas.<sup>12</sup>

As amostras semeadas em meio líquido foram processadas no MGIT até se revelarem positivas. Quarenta e dois dias após a semeadura, o sistema automatizado marca todas as amostras negativas restantes. Para meios LJ e OK, as amostras que não mostram crescimento em 45 dias, são normalmente reincubadas por mais 15 dias,<sup>7</sup> mas todas as nossas culturas positivas cresceram em 45 dias. Na ausência de microrganismos com morfologia micobacteriana em um período de 60 dias, as culturas foram consideradas negativas. O crescimento bacteriano inconsistente com *M. tuberculosis* e a ausência de detecção da proteína MPT64 caracterizaram micobactéria não-tuberculosa (MNT).<sup>12</sup> As culturas que desenvolveram outros tipos de crescimento bacteriano ou fúngico foram consideradas contaminadas.<sup>7</sup>

Os resultados (positivos, negativos ou contaminados) foram tabulados para cada método e tipo de material. A precisão do método OK foi avaliada em relação ao LJ, MGIT e a associação LJ + MGIT. O software SPSS (v. 24.0) e a calculadora online Critical Appraisal: Diagnostic Test (desenvolvida por D. J. R. Hutchon) foram usados para a análise estatística. O teste do qui-quadrado com correção de Bonferroni foi empregado para as comparações de frequência, adotando-se nível de significância de 5%. A precisão foi avaliada conforme Griner *et al.*<sup>13</sup> O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (parecer 2856464).

#### 4 RESULTADOS

Do total de 347 amostras investigadas (Tabela 1), 330 foram semeadas em meio OK, 314 em LJ e 113 em MGIT (As diferenças nos números das amostras refletem a escassez sazonal de meios de cultura ou volumes de amostra muito baixos para semeadura em todos os três meios).

Tabela 1. Distribuição por tipo de amostra recebida para cultura de *Mycobacterium tuberculosis*. Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil.

| Tipo de material                          | n (%)              |
|---|--------------------|
| <b>Material Extrapulmonar</b>             |                    |
| Líquido cérebro-espinhal                  | 98 (28,2)          |
| Medula óssea                              | 71 (20,5)          |
| Fragmentos de tecidos (não especificados) | 58 (16,7)          |
| Líquido pleural                           | 21 (6,1)           |
| Urina                                     | 16 (4,6)           |
| Sangue                                    | 12 (3,5)           |
| Linfonodos                                | 6 (1,7)            |
| Lavado gástrico                           | 3 (0,9)            |
| Líquido ascítico                          | 3 (0,9)            |
| Swab de material não especificado         | 1 (0,3)            |
| <b>Subtotal</b>                           | <b>289 (83,3)</b>  |
| <b>Material Pulmonar, exceto escarro</b>  |                    |
| Lavado bronco-alveolar                    | 24 (6,9)           |
| Secreção traqueal                         | 34 (9,8)           |
| <b>Subtotal</b>                           | <b>58 (16,7)</b>   |
| <b>Total</b>                              | <b>347 (100,0)</b> |

A taxa de positividade foi mais alta para OK (9,7%) e a taxa de contaminação mais alta para LJ (11,5%) (Tabela 2).

Tabela 2. Culturas realizadas para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras extrapulmonares, lavado broncoalveolar e secreção traqueal. Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil.

| Resultado    | Métodos de Cultivo |                  |                  |
|--------------|--------------------|------------------|------------------|
|              | O-K n (%)          | L-J n (%)        | MGIT n (%)       |
| Positivo     | 32 (9,7)           | 16 (5,1)         | 8 (7,1)          |
| Negativo     | 266 (80,6)         | 262 (83,4)       | 99 (87,6)        |
| Contaminado  | 32 (9,7)           | 36 (11,5)        | 6 (5,3)          |
| <b>Total</b> | <b>330 (100)</b>   | <b>314 (100)</b> | <b>113 (100)</b> |

OK: Ogawa-Kudoh; LJ: Löwenstein-Jensen; MGIT: Mycobacteria Growth Indicator Tube

Para cada método e tipo de amostra, as taxas de positividade foram submetidas ao teste do qui-quadrado com correção de Bonferroni ( $p > 0,05$ ), não revelando associações entre as técnicas (Tabela 3).

Tabela 3. Positividade das culturas de Mycobacterium tuberculosis, por tipo de amostra e método. Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil.

| Tipo de material                       | MGIT<br>% (n/total)    | L-J<br>% (n/total)      | O-K<br>% (n/total)       | p     |
|--|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------|
| <b>Material extrapulmonar</b>          |                        |                         |                          |       |
| Líquido céfalo-espinhal                | 0,0 (0/52)             | 3,6 (3/83)              | 4,8 (4/84)               | 0,297 |
| Swab de material não especificado      | -                      | -                       | 100,0 (1/1)              | -     |
| Medula óssea                           | 0,0 (0/8)              | 0,0 (0/62)              | 0,0 (0/69)               | -     |
| Biópsia/Fragmentos de tecidos diversos | 0,0 (0/4)              | 17,2 (6/42)             | 11,1 (5/41)              | 0,709 |
| Líquido pleural                        | 0,0 (0/7)              | 0,0 (0/17)              | 5,6 (1/18)               | 0,505 |
| Urina                                  | 12,5 (1/8)             | 6,7 (1/15)              | 8,3 (1/12)               | 0,892 |
| Sangue                                 | -                      | 0,0 (0/12)              | 0,0 (0/12)               | -     |
| Linfonodos                             | 33,3 (1/3)             | 33,3 (1/3)              | 50,0 (2/4)               | 0,503 |
| Lavado gástrico                        | -                      | 0,0 (0/2)               | 0,0 (0/2)                | -     |
| Líquido ascítico                       | 0,0 (0/2)              | 0,0 (0/3)               | 0,0 (0/3)                | -     |
| <b>Material pulmonar</b>               |                        |                         |                          |       |
| Secreção traqueal                      | 42,9 (6/14)            | 22,7 (5/22)             | 34,5 (10/29)             | 0,503 |
| Lavado bronco-alveolar                 | 0,0 (0/8) <sup>a</sup> | 0,0 (0/16) <sup>a</sup> | 36,4 (8/22) <sup>a</sup> | 0,005 |

Valores de *p* no teste do qui-quadrado. Letras idênticas na mesma linha indicam ausência de diferença entre os métodos (teste do qui-quadrado com correção de Bonferroni).

O desempenho OK foi comparado com os outros dois métodos no que diz respeito à sensibilidade, especificidade, precisão, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. (Tabela 4).

Tabela 4. Precisão do método Ogawa-Kudoh (OK), em comparação com Löwenstein-Jensen (LJ), Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT) e associação LJ + MGIT. Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil.

| Método Índice/<br>Método Referência | Sensibilidade<br>% (IC95%) | Especificidade<br>% (IC95%) | Acurácia<br>(%) | Valor Preditivo<br>Positivo (VPP)<br>% (IC 95%) | Valor Preditivo<br>Negativo (VPN)<br>% (IC 95%) |
|-------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|---|---|
| OK/MGIT<br>(n=88)                   | 75,00<br>(30,1 a 95,4)     | 100,00<br>(95,6 a 100,0)    | 98,86           | 100,00<br>(43,85 a 99,99)                       | 98,82<br>(93,63 a 99,79)                        |
| OK/LJ<br>(n=257)                    | 57,14<br>(32,6 a 78,6)     | 96,30<br>(93,1 a 98,0)      | 94,16           | 47,06<br>(29,16 a 69,03)                        | 97,50<br>(94,65 a 98,84)                        |
| OK/LJ +MGIT<br>(n=298)              | 56,25<br>(33,2 a 76,9)     | 91,84<br>(88,1 a 94,5)      | 89,93           | 28,13<br>(15,56 a 45,37)                        | 97,37<br>(94,66 a 98,71)                        |

IC95% = intervalo de confiança de 95%

A precisão de OK (98,86%) foi semelhante à do MGIT. A concordância entre os métodos é descrita na Tabela 5.

Tabela 5. Grau de concordância entre os métodos Ogawa – Kudoh (OK), Löwenstein – Jensen (LJ) e Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias (MGIT) em amostras pulmonares e extrapulmonares no Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS), Campo Grande (MS), Brasil.

| Pares (A vs B) | Total | A+/B+ | A-/A- | A+/B- | A-/B+ | Kappa | IC 95%      | Força             |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|-------------------|
| OK vs LJ       | 257   | 8     | 234   | 9     | 6     | 0,485 | 0,233-0,738 | Moderada          |
| OK vs MGIT     | 88    | 3     | 84    | -     | 1     | 0,851 | 0,562-1,000 | Quase<br>Perfeita |
| LJ vs MGIT     | 89    | 2     | 85    | 1     | 1     | 0,655 | 0,182-1,000 | Substancial       |

Categorias de valores de  $\kappa$ : ruim (<0,00); leve (0,00-0,20); razoável: (0,21-0,40); moderado (0,41-0,60); substancial (0,61-0,80); quase perfeito: (0,81-1,00).

## 5 DISCUSSÕES

Para reduzir os casos e óbitos por tuberculose, as populações vulneráveis devem ter maior acesso aos serviços de saúde,<sup>14</sup> e a disponibilidade de métodos diagnósticos para confirmar casos de suspeita clínica deve ser ampliada.<sup>2</sup>

No Brasil, a tuberculose extrapulmonar é menos frequente que a forma pulmonar, sendo, portanto, alvo secundário de programas nacionais de controle. No entanto, as taxas de tuberculose extrapulmonar aumentaram em todo o mundo, criando a necessidade de programas e recursos laboratoriais para melhorar o diagnóstico e os resultados do tratamento, especialmente em situações em que medidas de controle oportunas dependem de confirmação laboratorial rápida e precisa.<sup>15-18</sup>

Os países em desenvolvimento ficaram para trás no uso de tecnologia de ponta para o diagnóstico, e o combate a doenças como a tuberculose continua sendo um desafio.<sup>19</sup>

No Estado de Mato Grosso do Sul, a confirmação diagnóstica tem se baseado principalmente no processamento de MGIT, LJ e OK desde o final dos anos 1990, e em testes de diagnóstico rápido baseados em PCR desde 2014. No entanto, o teste rápido não pode ser aplicado a todos os tipos de amostras, nem dispensa a necessidade de cultura e teste de sensibilidade ao medicamento.<sup>5</sup>

As apresentações extrapulmonares (disseminadas ou não) são mais frequentes entre os indivíduos infectados pelo HIV, tornando mais prevalente o encaminhamento de casos suspeitos para serviços especializados ou de maior complexidade.<sup>4</sup>

Embora o método OK tenha sido relatado como sensível e específico para *M. tuberculosis* na detecção de doença pulmonar (amostras de escarro),<sup>19-21</sup> comparações de seu desempenho com a abordagem LJ (padrão ouro) permanecem escassas.<sup>22-24</sup>

No LACEN-MS, a abordagem OK tem se mostrado particularmente útil para o diagnóstico em minorias étnicas situadas remotamente, dado o baixo custo do método e

facilidade de operação, sem comprometer a viabilidade micobacteriana na etapa de descontaminação. O método está disponível atualmente para cerca de 60% da população do Estado.<sup>25</sup>

Para atender às recomendações do Ministério da Saúde do Brasil, os procedimentos da cultura OK foram implantados em outros laboratórios do Estado. Essa descentralização aumentou a confirmação diagnóstica para 48,8% dos casos notificados para a população indígena em 2001-2009<sup>26</sup> e para 55,0% e 81,8% para as populações carcerárias em 2007-2010 e 2011-2014, respectivamente.<sup>27</sup> Só recentemente o método foi sugerido para outras regiões do país, para expandir a cobertura diagnóstica das apresentações pulmonares.<sup>21</sup>

O diagnóstico confirmado por cultura se traduz em ganhos palpáveis na qualidade de vida, não só dos pacientes, mas também da comunidade, por agilizar a identificação e o tratamento de fontes bacilíferas, mesmo quando resistentes aos medicamentos.<sup>5,21</sup>

O baixo custo, estimado em US \$ 1,00 para cada tubo de meio de cultura, devido ao uso de glutamato de sódio em vez de asparagina, tem sido um fator determinante para o atual uso mais amplo do OK no Mato Grosso do Sul.<sup>28</sup>

Além disso, o meio de cultura conserva-se bem à temperatura ambiente, antes e depois da semeadura, facilitando o envio do meio para laboratórios remotos e o reenvio das culturas semeadas para o LACEN-MS. Os procedimentos de descontaminação são simples, dispensando a centrifugação e a necessidade de cabines de biossegurança. Nossos resultados revelaram uma taxa de contaminação de 9,7%, inferior ao limite recomendado de 10%<sup>29</sup> e semelhante à taxa encontrada para o processamento LJ e OK de amostras pulmonares e extrapulmonares no Equador.<sup>10</sup>

Apesar do sucesso no uso do OK para amostras pulmonares,<sup>28</sup> apenas dois estudos, com pequeno número de amostras (102 extrapulmonares, 33 pulmonares - lavado broncoalveolar) e restritos a um serviço especializado para pacientes com AIDS, foram publicados no Brasil.<sup>30-31</sup>

Um estudo com 685 amostras extrapulmonares paucibacilares (fezes, abscessos e outras fontes) realizado no Equador não encontrou diferença significativa ( $p = 0,668$ ) na capacidade diagnóstica entre LJ (88,2%) e OK (90,3%),<sup>10</sup> enquanto nossa comparação de três abordagens com amostras paucibacilares revelaram acurácia de 98,86% para OK, semelhante à obtida para o método MGIT, com concordância quase perfeita.

Ao reduzir o tempo de processamento, a abordagem OK produz o diagnóstico duas a três semanas antes dos outros métodos - uma vantagem crucial para os esforços de controle de

doenças. Além disso, pode ser realizado com um volume de amostra muito menor: um oitavo da quantidade exigida por outros métodos.<sup>10,16,17,18</sup>

Em nossa prática, o tempo necessário para o isolamento do *M. tuberculosis* se mostrou significativamente menor com o método OK, produzindo 77% de positividade em três semanas pós-incubação, em contraste com 6,1% para LJ, corroborando os achados de outro estudo.<sup>10</sup>

Em resumo, o método OK se mostrou preciso e específico para o diagnóstico de tuberculose em amostras paucibacilares e capaz de confirmar a doença com a mesma precisão dos métodos LJ e MGIT - características que o tornam adequado para uso na prática laboratorial de rotina em nível local e regional, particularmente onde os recursos são escassos.

Com base nas diretrizes da OMS, o Ministério da Saúde do Brasil recomenda um tempo de espera de 60 dias para o crescimento micobacteriano, independentemente do tipo de amostra. No LACEN-MS, entretanto, nenhum crescimento micobacteriano foi observado além de 45 dias, permitindo que pacientes com amostras previamente negativas fossem diagnosticados definitivamente 15 dias antes, liberando o laboratório para armazenamento e processamento de novos lotes de amostras.

A amostra de conveniência empregada nesta investigação foi obtida por meio de nossos procedimentos de rotina laboratorial. As restrições de amostras muito pequenas para semeadura em todos os três meios de cultura e a indisponibilidade temporária do meio Middlebrook 7H9 foram frequentes no período de estudo. Esses fatores imprevisíveis são responsáveis pelas diferenças no número de amostras processadas por cada método, uma limitação que pode ser superada em estudos futuros. Essas deficiências, no entanto, não afetaram nossos achados para amostras extrapulmonares.

O processamento OK provou ser uma excelente ferramenta de diagnóstico para amostras paucibacilares de apresentações pulmonares e extrapulmonares suspeitas, minimizando os riscos relacionados ao tempo de armazenamento, transporte e preservação da amostra. Nossos resultados, assim como os obtidos por Franco-Sotomayor et al.,<sup>10</sup> apoiam a adoção do método por laboratórios remotos para fins de semeadura.

Acreditamos que a adoção desse método pode contribuir para o diagnóstico mais rápido dos casos suspeitos de tuberculose pulmonar e extrapulmonar, minimizando as dificuldades enfrentadas pelos pacientes, a resistência aos fármacos<sup>32</sup> e promovendo uma redução significativa nas taxas de incidência e mortalidade associadas à doença em todo o mundo.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2020. WHO/Tb, 2020.
2. Denkinger CM, Kik SV, Cirillo DM, Casenghi M, Shinnick T, Weyer K, et al. Defining the needs for next generation assays for tuberculosis. *J Infect Dis.* 2015 Apr 1;211 Suppl2(Suppl 2):S29-38.
3. World Health Organization. Systematic Screening for Active Tuberculosis: Principles and Recommendations. WHO, 2013.
4. Sulis G, Centis R, Sotgiu G, D'Ambrosio L, Pontali E, Spanevello A, et al. Recent developments in the diagnosis and management of tuberculosis. *NPJ Prim Care Respir Med.* 2016; 26:16078.
5. Brasil. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 364 p.
6. Lopes AJ, Capone D, Mogami, R, Tessarollo B, Cunha DL, Capone RD et al. Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. *Pulmão RJ.* 2006; 15(4):253-61.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 436 p.
8. Pinto MFT, Steffen R, Entringer A, Costa ACC, Trajman A. Impacto orçamentário da incorporação do GeneXpert MTB/RIF para o diagnóstico da tuberculose pulmonar na perspectiva do Sistema Único de Saúde, Brasil, 2013-2017. *Cad. Saúde Pública,* 33(9), e 00214515.
9. Asmar S, Chatellier S, Mirande C, van Belkum A, Canard I et al. A Novel Solid Medium for Culturing Mycobacterium tuberculosis Isolates from Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* 2015 Aug;53(8):2566-9.
10. Franco-Sotomayor G, Rivera-Olivero IA, Leon-Benitez M, Uruchima-Campoverde SE, Cardenas-Franco G, Perdomo-Castro ME et al. Fast, Simple, and Cheap: the Kudoh-Ogawa Swab Method as an Alternative to the Petroff-Lowenstein-Jensen Method for Culturing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2020;58(4): e01424-19.
11. Pedro HSP, Nardi SMTT, Arroyo MGF, Maria IP, Goloni MRA, Ferrazoli L. Avaliação do desempenho dos meios de cultura Ogawa-Kudoh e MGITT M para isolamento de micobactérias. *BEPA* 2011; 8(91):5-13.
12. Chikamatsu K, Aono A, Yamada H, Sugamoto T, Kato T, Kazumi Y et al. Comparative evaluation of three immunochromatographic identification tests for culture confirmation of Mycobacterium tuberculosis complex. *BMC Infect Dis.* 2014;14:54.

13. Griner PF, Mayewski RJ, Mushlin AI, Greenland P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Principles and applications. *Ann Intern Med.* 1981; 94(4Pt2):557-92.
14. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2017.* WHO Press; 2017.
15. Gomes T, Reis-Santos B, Bertolde A, Johnson JL, Riley LW, Maciel EL. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in Brazil: a hierarchical model. *BMC Infect Dis.* 2014;14(9):1-9.
16. Parsons LM, Somoskövi A, Gutierrez C, Lee E, Paramasivan CN, Abimiku A, et al. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(2):314-50. Review.
17. Alavi SM, Bakhtiyariniya P, Albagi A. Factors associated with delay in diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis. *Jundishapur J Microbiol.* 2015; 8(3).
18. Procop GW. Laboratory Diagnosis and Susceptibility Testing for *Mycobacterium tuberculosis.* *Microbiol Spectr.* 2016;4(6). Review.
19. Takao EKH, Nocchi SR, Siqueira VLD, Cardoso MA, Peron MLD, Caleffi KR et al. Comparação de métodos de cultivo para o diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar. *Acta Sci. Health Sci.* 2005; 27(2):183-8.
20. Rodríguez DP, Castillo MC, Velásquez ML, García MO, Castillo HR, Ganoza EM. Comparación de los medios Ogawa y Löwenstein Jensen en el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar. Hospital Regional Docente de Trujillo, Perú. *Rev Méd Vallejana.* 2007; 4(1):24-31.
21. Costa RR, Da Silva SF, Fochat RC, Macedo RL, Pereira TV, Silva MR et al. Comparison between Kudoh-Ogawa and modified Petroff techniques for mycobacteria cultivation in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Einstein(São Paulo)* 2018;16(2):AO4214.
22. Jaspe RC, Rojas YM, Flores LA, Sofia Toro E, Takiff H, de Waard JH. Evaluation of the Kudoh swab method for the culturing of *Mycobacterium tuberculosis* in rural areas. *Trop Med Int Health.* 2009;14(4):468-71.
23. Rivas C, Coitinho C, Dafond V, Corbo M, Baldjian M. Performance of the Ogawa-Kudoh method for isolation of mycobacteria in a laboratory with large-scale workload. *Rev Argent Microbiol.* 2010;42(2):87-90.
24. Jobarteh T, Otu J, Gitteh E, Mendy F, Faal-Jawara TI, Ofori-Anyinam B et al. Evaluation of the Kudoh method for mycobacterial culture: Gambia experience. *Int J Mycobacteriol.* 2016; 5(supl.1):S166.
25. Cunha EAT, Marques M, Gonçalves TO. Benefícios advindos da técnica de Ogawa-kudoh para diagnóstico, controle e avaliação da tuberculose em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Saúde Pública de MS,* 2018;1(1):102-09. [cited 2020 May 20]. Available from: <http://revista.saude.ms.gov.br/index.php/rspms/article/view/20>

26. Basta PC, Marques M, Oliveira RL, Cunha EAT, Resende APC, Souza-Santos R. Desigualdades sociais e tuberculose: análise segundo raça/cor, Mato Grosso do Sul. *Rev. Saúde Públ.* 2013;47(5): 854-64.
27. Cunha EAT, Marques M, Evangelista MSN, Pompilio MA, Yassuda RTS, Souza AS. A diagnosis of pulmonary tuberculosis and drug resistance among inmates in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2018; 51(3): 324-30.
28. Palaci M, Peres RL, Maia R, Cunha EA, Ribeiro MO, Lecco R et al. Contribution of the Ogawa-Kudoh swab culture method to the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013;17(6):782-6.
29. Organizacion Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y Guía Técnica. Organizacion Panamericana de la Salud, 2008.
30. Boffo MMS, Mattos IG, Ribeiro MO, Jardim SV. Tuberculose extrapulmonar em pacientes com AIDS na cidade do Rio Grande, Brasil: diagnóstico laboratorial. *Rev Port Pneumol.* 2000;6(4):277-82.
31. Boffo MMS, Mattos IG, Ribeiro MO, Oliveira Neto IC. Tuberculose associada à AIDS: características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes atendidos em um serviço de referência do sul do Brasil. *J Bras Pneumol.* 2004;30(2):140-6.
32. Júnior ACV, Guedes DRS, Souza MS, Macedo CA, Medeiros RO, Alves HB, Neto HD, Silva DF. Avaliação do perfil epidemiológico da tuberculose e a sua coinfeção TB-HIV nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte. *Braz. J. of Develop., Curitiba,* v. 6, n. 1, p.441-456 jan. 2020.

## ANEXO - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
MATO GROSSO DO SUL -  
UFMS



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DO MÉTODO OGAWA-KUDOH PARA O DIAGNÓSTICO DA DA TUBERCULOSE EXTRAPULMONAR EM MATO GROSSO DO SUL, EM 2017 E 2018.

**Pesquisador:** Paulo Ricardo de Souza Moraes

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 89592218.6.0000.0021

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.856.464

## Apresentação do Projeto:

A pesquisa será baseada na utilização de dados secundários que serão buscados nos registros do LACEN. Os seguintes dados serão levantados: resultado de baciloscopia, da cultura nos meios MGIT, L-J e OK.

## Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo geral:** Analisar a eficiência do método Ogawa-Kudoh em comparação com métodos LowensteinJensen e MGIT para diagnóstico da tuberculose extrapulmonar no Estado de Mato Grosso do Sul.

**Objetivos específicos:** Analisar o crescimento das amostras extrapulmonares nos meios L-J, Ogawa-Kudoh e MGIT; Avaliar o tipo de amostra extrapulmonar positiva com o tempo de crescimento nos meios a serem avaliados; Relacionar a positividade da baciloscopia com o crescimento no meio Ogawa-Kudoh.

## Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme cita o pesquisador:

Riscos:

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS  
Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110  
UF: MS Município: CAMPO GRANDE  
Telefone: (87)3345-7187 Fax: (87)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
MATO GROSSO DO SUL -  
UFMS



Continuação do Parecer: 3.056.464

A pesquisa será baseada na utilização de dados secundários que serão buscados nos registros do LACEN/MS.

**Benefícios:**

Ampilar a técnica de cultivo de *M. tuberculosis* pelo método Ogawa-kudooh para materiais extra-pulmonar para diversos municípios.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta relevância científica e metodologia adequada.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresentação de termo de compromisso para uso de banco de dados, apresenta Autorização do Lacen para utilização desse banco de dados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Por se tratar de das duas pendências acima citadas:

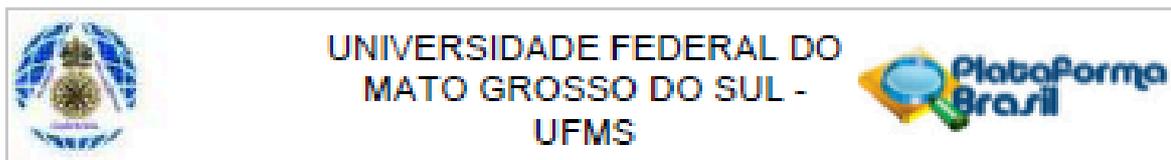
- 1-Termo de compromisso para uso de banco de dados que deve ser assinada; (ATENDIDO)
- 2-Não apresentação de Autorização do Lacen para utilização desse banco de dados. (ATENDIDO)

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento                   | Arquivo                                       | Postagem               | Autor                         | Situação |
|----------------------------------|---|------------------------|-------------------------------|----------|
| Recurso do Parecer               | recurso.pdf                                   | 09/07/2018<br>09:50:36 |                               | Acelto   |
| Outros                           | Util_bancodados.pdf                           | 09/07/2018<br>09:50:10 | Paulo Ricardo de Souza Moraes | Acelto   |
| Recurso Anexado pelo Pesquisador | aut_lacen.pdf                                 | 09/07/2018<br>09:48:12 | Paulo Ricardo de Souza Moraes | Acelto   |
| Informações Básicas do Projeto   | PE INFORMações BÁSICAS DO PROJETO 1093364.pdf | 08/05/2018<br>15:04:17 |                               | Acelto   |
| Outros                           | Pendencia_folha.pdf                           | 08/05/2018<br>15:02:39 | Paulo Ricardo de Souza Moraes | Acelto   |
| Brochura Pesquisa                | Capa_cep.doc                                  | 14/03/2018<br>10:01:48 | Paulo Ricardo de Souza Moraes | Acelto   |
| Declaração de Manuseio Material  | Uso_banco_dados.pdf                           | 14/03/2018<br>09:59:34 | Paulo Ricardo de Souza Moraes | Acelto   |

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS  
 Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110  
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE  
 Telefone: (87)3345-7187 Fax: (87)3345-7187 E-mail: biotica@propp.ufms.br



Continuação do Parecer: 3.050.464

|   |                     |                        |                                  |        |
|---|---------------------|------------------------|----------------------------------|--------|
| Biológico /<br>Biorepositório /<br>Biobanco     | Uso_banco_dados.pdf | 14/03/2018<br>09:59:34 | Paulo Ricardo de<br>Souza Moraes | Aceito |
| Projeto Detalhado /<br>Brochura<br>Investigador | Projeto.doc         | 14/03/2018<br>09:55:33 | Paulo Ricardo de<br>Souza Moraes | Aceito |
| Folha de Rosto                                  | Folha_Rosto.pdf     | 14/03/2018<br>09:53:35 | Paulo Ricardo de<br>Souza Moraes | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPO GRANDE, 30 de Agosto de 2018

---

Assinado por:  
Geraldo Vicente Martins  
(Coordenador)

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS  
 Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110  
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE  
 Telefone: (87)3345-7187 Fax: (87)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br